Vergleichende Untersuchungen zur Aktivität der β-Glucuronidase, des Gehaltes an Adeninnukleotiden und der Plättchenproteine in Säugetier-Thrombozyten verschiedener Spezies

Volker Burstedde

Diss. München
1984

Aus der Anatomischen Anstalt der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. H. Frick

Vergleichende Untersuchungen zur Aktivität der β-Glucuronidase, des Gehaltes an Adeninnukleotiden und der Plättchenproteine in Säugetier-Thrombozyten verschiedener Spezies

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Volker Burstedde

aus
Dortmund

Jahr
1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. K. U. Benner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H. Frick

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. 10. 84

Inhaltsverzeichnis

Seite

Einleitung 1

Material und Methoden

1. Untersuchte Spezies, Blutgewinnung, Herstellung der Plasmaproben und Thrombozytenzählung 3
2. Bestimmung der β-Glucuronidase-Aktivität 5
   a) Methode nach Fishman (modifiziert)
   b) Methode nach Szasz (modifiziert)
3. Bestimmung der Adeninnukleotide: ATP, ADP und AMP 9
4. Bestimmung der thrombozytenspezifischen Proteine: Plättchenfaktor 4 (PF_4) und β-Thromboglobulin (β-Tg) 13
5. Auswertung und Statistik 15

Ergebnisse

1. Aktivität der β-Glucuronidase 16
   a) Messung mit der modifizierten Fishman-Methode
   b) Messung mit der Methode nach Szasz (modifiziert)
2. Konzentration der Adeninnukleotide: ATP, ADP und AMP 19
3. Konzentration thrombozytenspezifischer Proteine 22
   a) Plättchenfaktor 4 (PF_4)
   b) β-Thromboglobulin (β-Tg)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546827_0027

Diskussion

Seite

1. Beurteilung der Ergebnisse der biochemischen Analysen unter Berücksichtigung der zur Meßprobenherstellung notwendigen Versuchsbedingungen 26
2. Aktivität der thrombozytären β-Glucuronidase 28
   a) Vorversuche zu den ausgewählten Enzym-Bestimmungsmethoden
   b) Ergebnisse der vergleichenden β-Glucuronidase-Bestimmungen
3. Ergebnisse der vergleichenden Adeninnukleotid-Bestimmungen 34
4. Thrombozytenspezifische Proteine: PF_4 und β-Tg 41
5. Vergleich von Inhalt und Morphologie der Thrombozyten verschiedener Säugetiere 44

Zusammenfassung 48

Literaturverzeichnis 51

Abkürzungen

ADP	:	Adenosindiphosphat
AMP	:	Adenosinmonophosphat
ATP	:	Adenosintriphosphat
β-Tg	:	β-Thromboglobulin
EDTA	:	Ethylendiamintetraacetate
$HClO_4$	:	Perchlorsäure
LA-PF_4	:	Low affinity-Plättchenfaktor 4
LDL	:	Low-Density-Lipoprotein
PBP	:	Platelet basic protein
PDGF	:	Platelet Derived Growth Factor
PF_4	:	Plättchenfaktor 4
PPP	:	Platelet Poor Plasma (plättchenarmes Plasma)
PRP	:	Platelet Rich Plasma (plättchenreiches Plasma)
RIA	:	Radioimmunoassay
S.E.M.	:	Standard Error of the Mean (Standardabweichung des Mittelwertes)

Einleitung

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems haben in allen zivilisierten Ländern in der zweiten Hälfte dieses Jahrhunderts zweifelsohne zugenommen; nach den Erhebungen des Statistischen Bundesamtes in Wiesbaden (124) ist die Zahl der auf solche Krankheiten zurückzuführenden Sterbefälle in der Bundesrepublik Deutschland innerhalb der vergangenen 35 Jahre sowohl absolut, als auch relativ deutlich angestiegen. Waren es 1949 noch 159.439 Patienten, die laut der zitierten Statistik direkt an den Folgen einer Herzkreislaufkrankheit starben – das sind 29 % aller für den genannten Zeitraum und Erhebungsbereich registrierten Todesfälle – so stieg deren Zahl 1981 auf 367.187 an, was einem Anteil von 51 % aller in diesem Jahr erfaßten Todesfälle entspricht. Herzkreislaufstörungen gelten heute nicht mehr als typische Erkrankungen des fortgeschrittenen Alters. Derselben Statistik zufolge befinden sich 12 % aller an einem akuten Herzmuskelinfarkt verstorbenen Männer in einem Lebensalter zwischen 22 und 55 Jahren.

Bei genauerer Aufschlüsselung der Todesursachen enthüllt sich, daß hier offenbar Störungen der Funktion der Blutplättchen maßgeblich beteiligt waren; alle Infarktformen, insbesondere der Herzinfarkt (39, 104) und die arteriellen Verschlußkrankheiten (3, 10, 28, 39, 137) gehören, wie die zahlreich bis heute vorgelegten Berichte demonstrieren, ebenso dazu, wie die z. Zt. neurologisch relativ oft diagnostizierten transitorischen ischämischen Attacken (19, 118, 129). Thrombozytäre Hyperreaktivitäten fanden sich auch bei Hypertonie (1, 78), idiopathisch-pulmonaler Hypertension (87), Präeklampsie (142) und der koronaren Herzkrankheit (11, 39, 139). Überhaupt scheinen alle Faktoren und Krankheiten, aufgrund derer sich sehr früh eine Arteriosklerose manifestiert, wie z. B. der Diabetes mellitus (6, 13, 18, 27, 59, 66, 67, 109), die Hyperlipidämien und -lipoproteinämien (14, 15, 56, 69, 120, 121), ja sogar intensives Zigarettenrauchen (38, 46) eine Steigerung der Plättchenadhäsivität und -aggregabilität zu bewirken. Bei einigen der vorher aufgeführten Krankheitsbilder ist die Thrombozytenhyperfunktion eventuell nur ein Epiphänomen, bei vielen möglicherweise jedoch die eigentliche Ursache.

Es verwundert daher nicht, daß sich die klinisch-pharmakologische, vor allem aber auch die pharmazeutische Forschung zunehmend bemüht hat, thrombozytenfunktionsregulierende Substanzen zu entwickeln (11, 17, 30, 94, 105, 108, 145). Solche Wirk-

stoffe werden, bevor sie auf Effekt und Nebenwirkungen am Menschen untersucht werden, in vorklinischen Prüfungen an den hierzu üblicherweise benutzten Laborversuchstieren getestet. Ausführliche Untersuchungen zur thrombozytären Reaktivität bei solchen Tieren haben aber auf erhebliche, zwischen den einzelnen Spezies und im Vergleich zum Menschen, bestehende Unterschiede aufmerksam gemacht (131, 132). Eines der Ziele der geplanten Studien war es deshalb, zu prüfen, ob die beschriebenen funktionellen Speziesdifferenzen der Blutplättchen mit biochemisch nachweisbaren Unterschieden des jeweiligen Thrombozytengehalts korrelieren. Zur Bestimmung wurden solche Substanzen ausgewählt, von denen – zumindest was Humanthrombozyten anbelangt – bekannt ist, daß sie in relativ hoher Konzentration bzw. ausschließlich in Blutplättchen enthalten und dort in (voneinander getrennten) Speicherorganellen lokalisiert sind, aus denen sie auf adäquaten Reiz hin exozytiert werden können. Im einzelnen wurden zur vergleichenden Bewertung analysiert:

a) die Aktivität der β-Glucuronidase, einer sauren Hydrolase, die nach Ansicht zahlreicher Autoren eine bedeutsame Rolle bei der Arteriosklerose entstehung spielen soll (9, 25, 26, 63, 64, 68, 81, 84, 90)

b) die Adeninnukleotide ATP, ADP und AMP, von denen bekannt ist, daß sie eine Thrombozytenaggregation induzieren bzw. inhibieren können (85, 114) und

c) den Plättchenfaktor 4 (PF_4) und β-Thromboglobulin (β-Tg), beides Eiweiße, die unter physiologischen Verhältnissen ausschließlich in Thrombozyten vorkommen sollen (74, 97), deren Nachweis im Plasma deshalb als Indikator einer gesteigerten Plättchenreaktivität bzw. eines erhöhten Thrombozytenumsatzes in vivo angesehen wird (44, 62, 70, 74, 91).

Material und Methoden

1. Untersuchte Spezies, Blutgewinnung, Herstellung der Plasmaproben und Thrombozytenzählung

In Tab. I sind die zehn verschiedenen Spezies aufgeführt, mit deren Blutplättchen die geplanten Untersuchungen vorgenommen wurden. Sie liefert außerdem einen Überblick über die Anzahl der pro Spezies und Versuchsserie getesteten Individuen und die unterschiedlichen Blutentnahmetechniken.

Tab. I: Übersicht über untersuchte Spezies, Blutentnahmetechniken und Anzahl der pro Spezies und Versuchsserie getesteten Individuen.

		Anzahl der untersuchten Individuen bei der Bestimmung von			
SPEZIES	Blut-entnahme technik	β-Glucuronidase F.	β-Glucuronidase S.	Adeninnukleotide (ATP, ADP, AMP)	Thrombozyten-spezifische Proteine PF_4, β-Tg
Mensch	C	15	5	9	8
Schwein	B	5	5	5	4
Kaninchen	B	5	4	4	2
Katze	B	5	4	4	2
Hund	A	8	3	7	5
Meerschweinchen	B	5	4	6	6
Rind	A	8	2	5	0
Pferd	A	8	6	6	3
Schaf	A	4	4	5	3
Ziege	A	7	6	6	3

A = Punktion der Vena jugularis externa durch eine Metallkanüle
B = Über einen im linken Ventrikel liegenden PVC-Katheter, der in die präparierte Arteria carotis communis sinistra eingeführt wurde; vorausgehende Anästhesie mit Ketaminhydrochlorid
C = Punktion einer Cubitalvene durch eine Metallkanüle

F. = Fishmann-Methode
S. = Methode nach Szasz

Bei den klinisch gesunden Testpersonen, die verschiedenen Geschlechts und im Alter zwischen 18 und 50 Jahren waren, wurde darauf geachtet, daß vor Versuchsbeginn (innerhalb der letzten 10 Tage) keine thrombozytenfunktionsverändernde Behandlung stattgefunden hatte.

Das Blut der Großtiere wurde in den Tierställen der Gynäkologischen bzw. Andrologischen Abteilung der Tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München sowie im Tierstall der Gesellschaft für Strahlenforschung (GSF) von Veterinären in der in Tab. I angegebenen Weise entnommen. Die untersuchten Kleintiere stammten aus dem Tierstall des Pharmakologi-

schen Instituts der TU-München. Da bei der Herstellung von Ratten-PRP stets eine Hämolyse stattfand, wurden diese Versuchstiere von den vorgesehenen vergleichenden Studien ausgenommen.
Die den verschiedenen Analysen dieser Arbeit gemeinsam zugrundeliegenden vorbereitenden und begleitenden technischen Abläufe sind in Abb. 1 schematisch dargestellt.

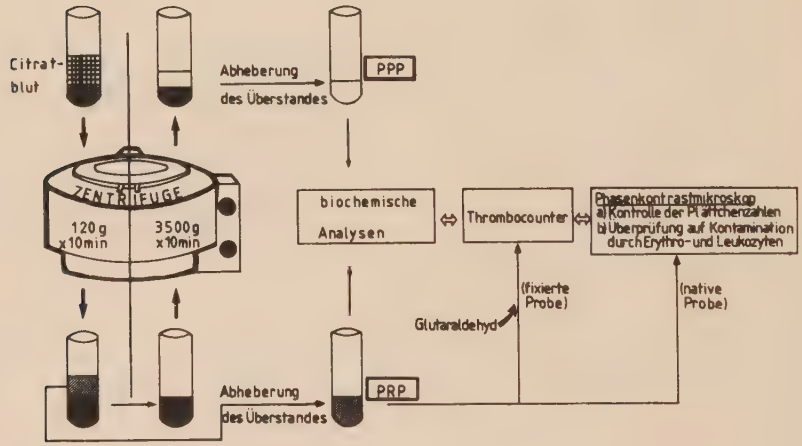

Abb. 1: Piktographische Darstellung der für alle vorgesehenen Studien weitgehend identischen Maßnahmen zur Vorbereitung der Meßproben.

Alle Blutproben wurden in kalibrierten Plastikzentrifugenröhrchen aufgefangen, in denen zur Hemmung der Blutgerinnung eine 3,8%-ige Na-Citrat-Lösung (Endvolumenverhältnis Na-Citrat-Lösung : Blut = 1 : 10) vorgelegt worden war. Unmittelbar nach ihrer Entnahme wurden die Proben luftdicht verschlossen und vorsichtig, aber intensiv vermischt. Damit wurde eine Äquilibrierung des Blutes mit den Raumgasen, die über pH-Wert-Verschiebungen Thrombozytenfunkionsänderungen zur Folge hätte haben können (43), weitgehend unterbunden und eine eventuelle dadurch hervorgerufene Freisetzung intrathrombozytär gespeicherter Substanzen erschwert. Alle Blutproben wurden bis zur weiteren Aufarbeitung in einem Wasserbad bei 37°C aufbewahrt.

Die eigentlichen Bestimmungen wurden, wie Abb. 1 verdeutlicht, mit PRP (plättchenreiches Plasma) und PPP (plättchenarmes Plasma) durchgeführt. Dazu wurde das Vollblut zunächst für die Dauer von 10 min bei 120 g zentrifugiert und das PRP mit Plastikpipetten in verschließbare Kunststoffröhrchen überführt. Durch phasenkontrastmikroskopische Kontrollen wurde überprüft, ob die PRP-Proben neben den Blutplättchen noch Erythro- oder Leukozyten enthielten; war dies der Fall, wurden die Proben verworfen. Anschließend wurde der Rückstand erneut, diesmal bei 3500 g für die Dauer von 10 min zentrifugiert, der weitgehend thrombozytenfreie Überstand (PPP) abgehoben und aufbewahrt. Es wurde stets darauf geachtet, daß alle biochemischen Analysen innerhalb der ersten zwei Stunden nach Blutentnahme durchgeführt oder zumindest eingeleitet worden waren.

Zur Bestimmung des Thrombozytengehaltes wurden jeweils 10 µl PRP in 1 ml einer Glutaraldehydlösung pipettiert, die Proben für mindestens 10 min (bei Raumtemperatur) inkubiert und die nun stabilisierten Plättchen elektronisch gezählt (Thrombocounter TOA PL 100; Colora Meßtechnik GmbH, München). Die elektronischen Thrombozytenzahlbestimmungen wurden je Probe zweimal wiederholt. Das zur Fixation benutzte 1,7 %-ige Glutaraldehyd wurde durch Verdünnung einer 25 %-igen Stammlösung mit einer blutisotonen, puffernden Stabilisatorlösung (Isoton II, Coulter Electronics GmbH, Krefeld) hergestellt. Die elektronisch ermittelten Resultate wurden stichprobenweise unter Verwendung der klassischen Thrombozytenzähltechnik (Mikroskop, Neubauer-Zählkammer) überprüft; stets fanden sich gut übereinstimmende Werte. Wiederholte Kontrollen in mehrwöchigen Intervallen zeigten, daß die Zahl der fixierten Blutplättchen konstant blieb.

2. Bestimmung der β-Glucuronidase-Aktivität

a) Methode nach Fishman (modifiziert)

Die Aktivität der β-Glucuronidase in PRP und PPP wurde zunächst mit einer modifizierten, ursprünglich von Fishman et al. (32) für Serumproben angegebenen Methode gemessen, wobei als Substrat des Enzyms Phenolphtalein-β-glucuronid diente. Hierbei gilt als Maß der Enzymaktivität die in konstanter Zeit von dem Substrat abgespaltene Menge des photometrisch quantifizierbaren Phenolphtaleins (Abb. 2).

Die in der vorliegenden Untersuchung benutzte Technik wich von der Originalmethode darin ab, daß anstelle eines 0,1 molaren ein 0,2 molarer Acetatpuffer verwendet wurde. Durch die höhere Molarität des Puffers blieb der pH-Wert der Meßprobe während der gesamten Inkubationsperiode konstant, was, wie Vorversuche gezeigt hatten, bei niedrigeren Pufferkonzentrationen nicht gewährleistet war. Außerdem wurde die Inkubationstemperatur – um eine vollständige Thrombozytolyse zu erreichen – von 37°C auf 56°C erhöht, die Inkubationsdauer dafür von 3 Std. auf 1 Std. verkürzt.

Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml AMP-Puffer (2-Amino-2-Methyl-1-Propanol-Puffer) zur Meßprobe beendet und die Proben-Extinktion nach 10 min gegen Wasser (als Leerwert) in einem Spektralphotometer (Beckman Spektrophotometer Modell 24; Fa. Beckman, München) bei 550 nm gemessen. In Tab. II sind die Zusammensetzungen der verschiedenen Inkubationsansätze sowie die in den Ansätzen enthaltenen PRP- und PPP-Volumina aufgeführt.

Tab. II: Zusammensetzung der Inkubationsansätze bei der modifizierten Fishman-Methode.

Die Inkubation wurde durch Zusatz von 5 ml AMP-Puffer beendet

(Angaben in ml)

REAGENZIEN	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5
Na-Acetat-Puffer (0,2 M, pH 4,5)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Phenolphthalein-β-glucuronid (0,03 M, pH 4,5)	0,2	0	0	0,2	0,2
Aqua bidest	0,2	0,2	0,2	0	0
PPP	0	0,2	0	0,2	0
PRP	0	0	0,2	0	0,2

A_1 = Reagenzienleerwert

A_2 = Leerwert des plättchenarmen Plasmas (PPP)

A_3 = " " plättchenreichen " (PRP)

A_4 = Ansatz zur Bestimmung der Enzymaktivität im PPP

A_5 = " " " " " " PRP

Tab. III: Ansätze zur Erstellung der Phenolphthalein-Eichkurve für die modifizierte Fishman-Methode (Angaben in ml)

Ansätze	Lösung A	Lösung B	Phenolphthalein (µg/ml)
a	5,7	0,3	2,0
b	5,4	0,6	4,0
c	5,1	0,9	6,0
d	4,8	1,2	8,0

Lösung A:

Na-Acetat-Puffer (0,2 M; pH 4,5) 3,6 ml

Aqua bidest 2,4 ml

AMP-Puffer 30,0 ml

Lösung B

Phenolphthaleinstandard (1 mg/ml in Äthanol) 0,2 ml

Lösung A 4,8 ml

(Reagenzien: Sigma Chemie GmbH, München)

Aus den photometrierten Extinktionswerten (E) dieser Ansätze errechnen sich diejenigen für PRP und PPP nach den folgenden Gleichungen (Probenbezeichnungen s. Tab. II):

$$(I)\quad E_{PRP} = E_{A5} - (E_{A3} + E_{A1})$$

und

$$(II)\quad E_{PPP} = E_{A4} - (E_{A2} + E_{A1})$$

Zur Umsetzung der Extinktionswerte in die entsprechenden Enzymaktivitäten wurde jeweils pro verwendeter Reagenziencharge eine Eichkurve erstellt; die Zusammensetzung der pro Kurve benötigten vier Meßansätze sind in Tab. III angegeben. Anhand der Eichkurven konnten nun aus den Extinktionswerten die in den Inkubationsansätzen jeweils freigesetzten Phenolphthaleinkonzentrationen ermittelt und daraus nach folgender Gleichung die Aktivität (in U) der in 1 ml Plasma enthaltenen β-Glucuronidase errechnet werden:

(III) U/ml Plasma = freigesetzte Phenolphthaleinkonzentration (µg/ml) X 30;

der Faktor 30 ergibt sich durch Division des Ansatzendvolumens (6 ml) durch das Volumen der eingesetzten Plasmaprobe (0,2 ml).

Subtrahiert man die so berechneten Aktivitäten (A, in U) des PRP und PPP voneinander, so erhält man die intrathrombozytäre Enzymaktivität der Blutplättchen, die in 1 ml PRP enthalten sind.

$$(IV)\quad A_{Thrombozyten} = A_{PRP} - A_{PPP}$$

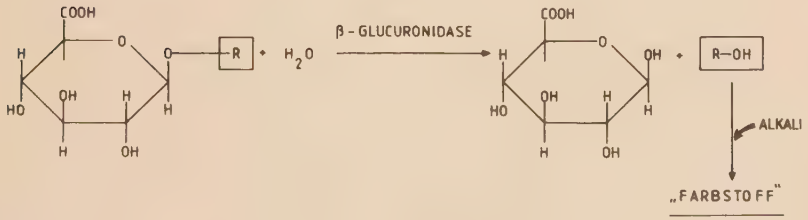

Abb. 2: Reaktionsprinzip der Methoden zur β-Glucuronidase-Bestimmung: hydrolytische Spaltung eines Glucuronids in Glucuronsäure und ein photometrisch nachweisbares Aglykon R (Phenolphthalein oder p-Nitrophenol).

b) Methode nach Szasz (modifiziert)

Die von Szasz (127) 1967 beschriebene Technik zur Quantifizierung der β-Glucuronidase-Aktivität im Serum basiert ebenfalls auf dem im vorhergehenden erläuterten Prinzip der Fishman-Methode (Abb. 2); anstelle von Phenolphthalein-β-glucuronid wird jedoch als Substrat p-Nitrophenylglucuronid benutzt. Dies soll nach Szasz (127) und Nimmo-Smith (100) den Vorteil besitzen, keine, von seiner Konzentration abhängige, enzyminhibierende Wirkung aufzuweisen. Darüber hinaus soll die Farbintensität des enzymatisch freigesetzten p-Nitrophenols in einem weiten pH-Bereich über Stunden unverändert bleiben. Da das Ziel der vorliegenden Studie die Quantifizierung der gesamten intrathrombozytären Enzymaktivität war, mußte die von Szasz angegebene Methode modifiziert werden. Ausführliche Vorversuche hatten gezeigt, daß eine vollständige Thrombozytolyse nur dann stattfand, wenn die Inkubationstemperatur der Meßansätze von 25°C auf 56°C angehoben wurde. Die Inkubationsdauer konnte dafür von 5 Std. auf 1 Std. verkürzt werden.

Tab IV: Zusammensetzung der Inkubationsansätze bei der Methode nach Szasz

Die Inkubation wurde durch Zusatz von 200 µl 0,35 n NaOH-Lösung gestoppt. (Angaben in µl)

REAGENZIEN	A	AL	RL	ST	WL
Essigsäure-Na-Acetat-Puffer (0,2 M nach Walpole ; pH 4,0)	400	400	400	400	400
Aqua bidest	0	50	50	50	100
p-Nitrophenol-Standard (Gebrauchslösung: 300 µM)	0	0	0	50	0
p-Nitrophenyl-β-glucuronid (50 mM)	50	0	50	0	0
PRP bzw. PPP	50	50	0	0	0

A: Analyse ; AL: Analysenleerwert ; RL: Reagenzienleerwert ; ST: Standard WL. Wasserleerwert

Substratlösung: p-Nitrophenyl-β-glucuronid (Fa. Merck, Darmstadt) 78,75 mg in 5 ml Aqua bidest gelöst ≙ 50 m M

Standardlösung: a) Stammlösung: 41,76 mg p-Nitrophenol (Fa. Merck, Darmstadt) in 100 ml NaOH (0,02 M) gelöst ≙ 3 mM

b) Gebrauchslösung Stammlösung mit NaOH (0,02 M) 1:10 verdünnt ≙ 300 µM

Durch Zugabe von 200 µl einer 0,35 n NaOH-Lösung wurde die hydrolytische Spaltung des Glucuronids in Glucuronsäure und p-Nitrophenol gestoppt, 30 min später die Extinktion (E) der Testproben bei 405 nm in Halbmikroküvetten (d = 1 cm) gegen einen Leerwert (Wasser) photometriert. Alle Testansätze waren durch die NaOH-Lösung einheitlich auf einen pH-Wert von 11,8 – 12,1 eingestellt. Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze sowie der Substrat- und Standardlösung ist Tab. IV zu entnehmen. Mit Hilfe einer bei jeder Bestimmung mitgemessenen Standardprobe (ST) wurde die abgespaltene p-Nitrophenolkonzentration (K) der Analyseansätze (A) wie folgt berechnet:

$$(V)\ K_A : E_A = K_{ST} : E_{ST}$$

Eine Einheit (1U) β-Glucuronidase wurde definiert als die Aktivität, die innerhalb einer Stunde bei 56°C 1 µg p-Nitrophenol freisetzte.

3. Bestimmung der Adeninnukleotide: ATP, ADP und AMP

Die Adeninnukleotidkonzentrationen wurden mit der von Holmsen beschriebenen (53) Firefly-Luciferase-Methode bestimmt. In Abb. 3 sind z. T. unter Verwendung von Strukturformeln die dabei stattfindenden Reaktionsschritte dargestellt:
In Gegenwart von Mg^{++} und ATP setzt die Initialreaktion, die schnelle Umwandlung des Luciferins zu Luciferyladenylat, ein. Durch die Einwirkung der Luciferase und die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff wird Oxyluciferyl-Adenylat-Enzym-Komplex gebildet, der sich in einem angeregten, energiereichen Zustand befindet. Der Komplex zerfällt in die Reaktionsprodukte und das freie Enzym, wobei Energie in Form von Lichtquanten emittiert wird. Dieses wird von einem Photomultiplier verstärkt und mit einem Kompensationsschreiber (Houston Omniscribe TM 5 200-0) aufgezeichnet.

Da nur ATP nach dem beschriebenen Mechanismus reaktionsfähig und nachweisbar ist, mußten die im Ansatz vorhandenen Nukleotide ADP und AMP vor ihrer Bestimmung zu ATP phosphoryliert werden (Tab. V).

In allen Versuchsserien wurde prinzipiell der gesamte thrombozytäre Gehalt an Adeninnukleotiden bestimmt. Dazu wurden 0,5 ml PRP bzw. PPP mit 4,5 ml von Mikroorganismen gereinigtem Tris-EDTA-Puffer (50 mM Tris- 4 mM EDTA, pH 7,75) versetzt. Durch

dreiminütige Inkubation dieser Proben wurden die Thrombozyten bei 98°C in einem Wasserbad vollständig lysiert. Diese PRP- und PPP-Aufschlüsse wurden bei kurz darauffolgender weiterer Aufarbeitung auf Eis gekühlt bzw. bei längerem Intervall zwischen Thrombozytolyse und den Bestimmungen der Nukleotide bei –20°C aufbewahrt.

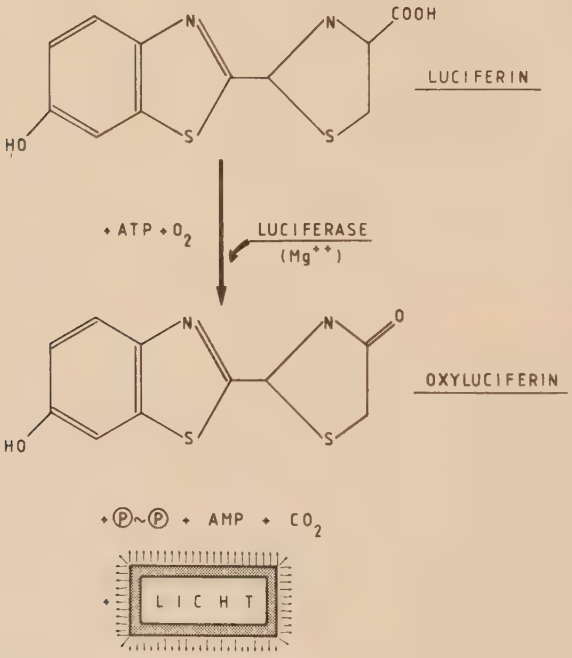

Abb. 3: Reaktionsmechanismus der Firefly-Luciferase-Methode; (P)–(P) = Pyrophosphat

Zur Messung wurden jeweils 50 µl des PRP- bzw. PPP-Testansatzes (Tab. V) in einer Halbmikroküvette (d = 1 cm) mit 100 µl Luciferin-Luciferase, gelöst in 25 mM Hepes-Puffer (pH 7,75), versetzt, innerhalb von 10 sec gemischt und in den Küvettenhalter eines Lumineszenz-Meßgerätes gestellt. Als Luminometer diente ein Einkanalfilterfluorimeter (Baird-Atomic Filterfluorimeter FM 200 mit Photomultiplier Typ 931 A), dessen Probenraum für die Biolumineszenzbestimmungen derart umgebaut worden war, daß er absolut lichtdicht verschlossen, der zum Photomultiplier gerichtete Emissionsspalt jedoch geöffnet war.

Tab. V: Zusammensetzung der Testansätze zur Biolumineszenzbestimmung der Adeninnukleotide; Prinzip der Hilfsreaktionen, die zur Phosphorylierung von ADP und AMP zu ATP führen; Rechenschritte zur Berechnung der Einzelnukleotide.

Ansatz-Nr.	TESTANSÄTZE: PRP- bzw. PPP-Aufschluß	TESTANSÄTZE: Reaktionsgemisch	HILFSREAKTIONEN (Phosphorylierung von ADP und AMP)	Bestimmung von
1	100 µl	100 µl A	———	ATP
2	100 µl	100 µl B	ADP + Phosphoenolpyruvat (PEP) $\xrightarrow[K^+;\ Mg^{++}]{\text{Pyruvat-kinase}}$ ATP + Pyruvat	ATP + ADP
3	100 µl	100 µl C	AMP + ATP $\xrightarrow[Mg^{++}]{\text{Myokinase}}$ ADP + PEP $\xrightarrow[K^+;\ Mg^{++}]{\text{Pyruvat-kinase}}$ ATP + Pyruvat	ATP + ADP + AMP

A = Hepes-Puffer (25 mM + 10 mM KCl; pH 7,75)
B = Phosphoenolpyruvat + Pyruvatkinase (in Hepes-Puffer)
C = Myokinase + PEP + Pyruvatkinase (in Hepes-Puffer)

Berechnung der Einzelnukleotide

ATP (aus Ansatz 1)
ADP = (ATP+ADP) − ATP (aus Ansatz 1 und 2)
AMP = (ATP+ADP+AMP) − (ATP+ADP) (aus Ansatz 1, 2 und 3)

Zur Errechnung der Nukleotidkonzentrationen aus den mit dem Kompensationsschreiber registrierten Lichtsignalen, wurde mit Proben definierten ATP-, ADP- und AMP-Gehaltes eine Eichkurve erstellt (Abb. 4).

Diese Proben waren genauso vorbehandelt worden wie die aufgeschlossenen PRP- und PPP-Ansätze (Tab. V). Die verschiedenen ATP-Konzentrationen (in ng: entweder direkt im ATP-Standardansatz enthalten oder durch Phosphorylierung im ADP- bzw. AMP-Standardansatz gewonnen) und die durch diese hervorgerufenen Biolumineszenzwerte (in %) wurden in einem Koordinatensystem gegeneinander doppeltlogarithmisch aufgetragen. Anhand dieser Geraden konnten so aus den Biolumineszenzwerten, die mit den verschiedenen PRP- und PPP-Testansätzen erzielt wurden, die darin enthaltenen ATP-Konzentrationen abgelesen bzw. mit der Exponentialfunktion der Regression errechnet werden. Eine Differenzierung in die Einzelnukleotide ATP, ADP und AMP war durch die in Tab. V angegebenen Rechenschritte möglich. Unter der Voraussetzung der äquimolaren Umsetzung mußten die verschiedenen Molekulargewichte der drei Nukleotide zusätzlich berücksichtigt werden, sodaß sich folgende Umrechnungsfaktoren ergaben: 1 ng ATP ≙ 0,84 ng ADP und 1 ng ATP ≙ 0,68 ng AMP.

Bei der Erstellung der Eichkurve wurden gleichzeitig die benutzten zur Phosphorylierung benötigten Enzymsysteme auf ihre Effektivität hin überprüft. Vorversuche hatten gezeigt, daß die Bestimmung mittels Eichkurve im Vergleich zur Methode der internen Standardisierung identische Ergebnisse lieferte. Bei dem zuletzt genannten Verfahren werden die unbekannten Nukleotidkonzentrationen anhand zweier Vergleichsmessungen ermittelt: der Biolumineszenzwert einer Probe wird zu dem registrierten Lichtsignal desselben Testansatzes, der jedoch zuvor mit einer definierten Menge (Standard) des zu bestimmenden Nukleotids versetzt worden war, in Bezug gesetzt.

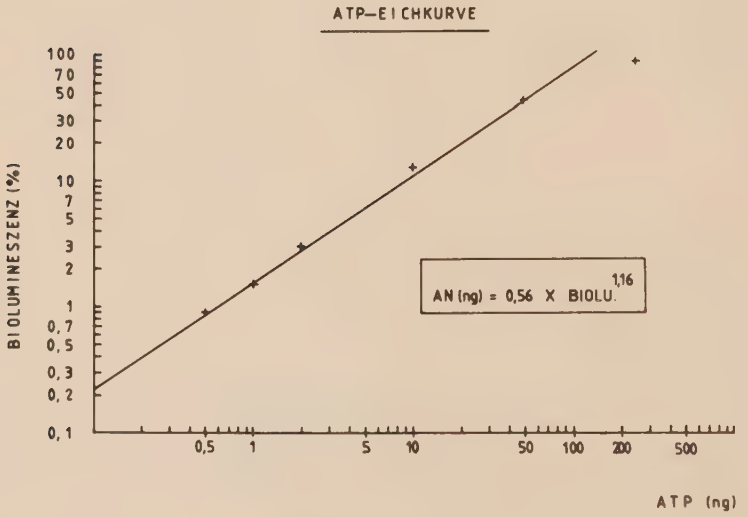

Abb. 4: ATP-Eichkurve zur Bestimmung der Adeninnukleotide durch Biolumineszenz. ATP (in ng) ist gegen die Biolumineszenz (in %) doppeltiogarithmisch aufgetragen. Die angegebene Exponentialfunktion beschreibt die Regressionsgerade. (AN = Adeninnukleotide, BIOLU. = Biolumineszenz)

Alle für die Biolumineszenzbestimmungen notwendigen Reagenzien wurden von der Firma Lumac B. V. über die Firma Abimed in Düsseldorf bezogen.

4. Bestimmung der thrombozytenspezifischen Proteine: Plättchenfaktor 4 (PF_4) und β-Thromboglobulin (β-Tg)

Nach den Untersuchungen von Rucinski, B. et al. (116) heben die nur in Thrombozyten befindlichen Proteine PF_4 und β-Tg die gerinnungshemmende Wirkung von Heparin auf. Zur vergleichenden Analyse des intrathrombozytären Gehalts an solchen plättchenspezifischen Proteinen wurden zunächst zwei Methoden auf ihre Verwendbarkeit geprüft, die auf dieser Antiheparinaktivität basieren. Die erste Technik, das „Heparin-Thrombin-Gerinnungszeitverfahren", benutzt die Beobachtung, daß Protaminsulfat und die genannten thrombozytenspezifischen Proteine einen vergleichbaren, quantitativen Hemmeffekt auf Heparin ausüben (98, 103). Verschiedenen (sog. standardisierten) Plasmaproben wurden dieselbe Konzentration an Heparin, jedoch unterschiedliche Mengen Protaminsulfat zugesetzt. Unter identischen Meßbedingungen (z. B. durch Verwendung eines temperierbaren Koagulometers mit konstanter Rührgeschwindigkeit) wurde in jeder Plasmaprobe nach Zugabe derselben Thrombinmenge das Auftreten der ersten Fibrinfäden elektrisch registriert und dieser Zeitwert gegen die entsprechenden Protaminsulfat-Konzentrationen aufgetragen. In gleicher Weise wurden dann PPP- bzw. PRP-Proben (mit unterschiedlichem Thrombozytengehalt) behandelt – mit dem Unterschied, daß anstelle einer Protaminzugabe die Thrombozyten zum Zwecke einer Freisetzung heparininhibierender Proteine mit 1%-igem Triton X 100 (5% des Plasmavolumens) lysiert wurden. Ein Vergleich der Fibrinfäden-Bildungszeit mit derjenigen in den Kontrollversuchen sollte dann die jeweils vorhandene Aktivität der Proteine, angegeben in Protamin-Referenzwerten, geben.

Die zweite der im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf Praktikabilität getesteten Methoden (136) beruht darauf, daß der plasmatische Gerinnungsfaktor Xa von einem, dem Plasma zuzusetzenden chromogenen Substrat S 22 22 (Benzoyl-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilid) p-Nitroanilin abspaltet. Der Abspaltungsprozeß soll quantitativ durch Heparin gehemmt werden. Die Menge an p-Nitroanilin läßt sich photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmen. Hält man demnach die Konzentration von Heparin und Faktor Xa im Testansatz konstant, soll um so mehr p-Nitroanilin abgespalten werden, je höher die Plasmakonzentration der thrombozytenspezifischen Proteine ist.

Beide Methoden des indirekten PF_4- und β-Tg-Nachweises liefer-

ten jedoch schon bei der Erstellung der Eichkurven keine reproduzierbaren Werte; sie wurden deshalb bei den weiteren Untersuchungen nicht eingesetzt.

Als direkte, spezifische Nachweismethode für beide Thrombozytenproteine gilt deren radioimmunologische Bestimmung, der das Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion zugrunde liegt. Diese Radioimmunoassays, die schließlich für die vergleichenden Untersuchungen der vorliegenden Arbeit gewählt wurden, sind kompetitive Tests (PF_4-RIA, Fa. Abbott GmbH, Langen; β-Tg-RIA, Fa. Buchler Amersham, Braunschweig). Am Beispiel des PF_4-RIA sollen die dabei ablaufenden Reaktionen kurz erläutert werden (Abb. 5): nicht-radioaktiv-markiertes PF_4 im Plasma konkurriert mit einer konstanten Menge ^{125}J-PF_4 um Bindungsstellen einer begrenzten Menge von PF_4-Antikörpern.

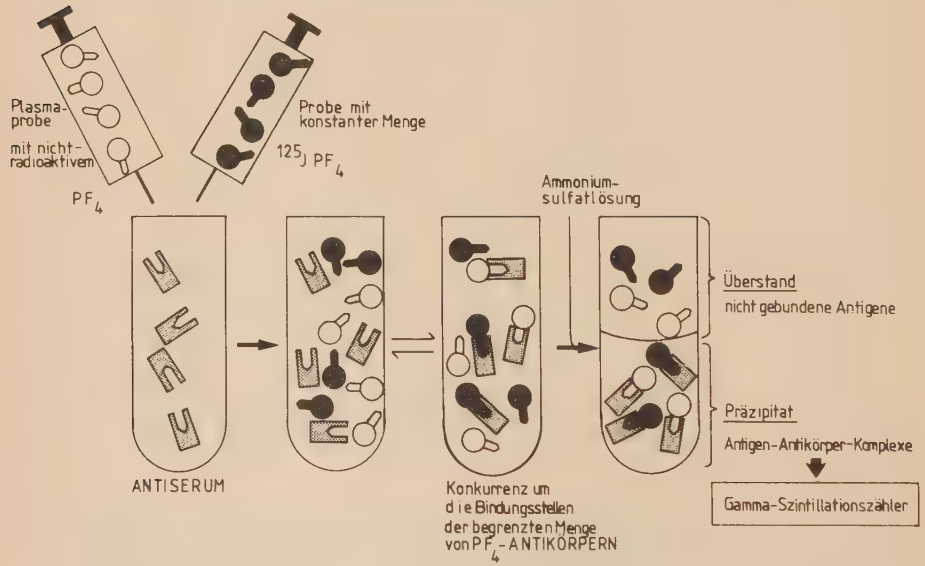

Abb. 5: Reaktionsprinzip der kompetitiven Radioimmunoassays (RIA) zur Bestimmung der thrombozytenspezifischen Proteine am Beispiel des Plättchenfaktor 4 (PF_4).

Somit ist der Prozentsatz an radioaktivem PF_4, das an Antikörper gebunden ist, umgekehrt proportional der Konzentration an nicht-radioaktiv-markiertem PF_4 in der Probe. Im einzelnen werden zu 50 µl PRP bzw. PPP jeweils 250 µl ^{125}J-PF_4-Lösung und 250 µl Antiserum gegeben. Zuvor waren die Thrombozyten der Plasmaproben durch die Einwirkung von 1%-igem Triton X 100 (5 Vol.-%) lysiert

worden (die Lysate wurden bis zur Proteinbestimmung bei –20°C aufbewahrt). Diese Analyseansätze werden für 3 – 5 sec durchmischt und die Röhrchen 2 Std. bei Zimmertemperatur (15 – 30°C) inkubiert. Das an die Antikörper gebundene PF_4 (sowohl das radioaktive, als auch das unmarkierte) wird mit Hilfe einer gesättigten 73%-igen Ammoniumsulfatlösung (1 ml) präzipitiert. Nach Zentrifugation für 20 min bei 1000 bis 1500 g und Zimmertemperatur kann die Radioaktivität in diesem Komplex dann mit einem Gamma-Szintillationszähler (Nuclear Chicago 1185) gemessen werden. Die genaue PF_4-Konzentration der Probe ergibt sich durch den Vergleich mit verschiedenen Standards, die bekannte Mengen nicht-radioaktiv-markiertes PF_4 enthalten. Nach dem gleichen für PF_4 angegebenen RIA-Prinzip wird ebenso β-Tg bestimmt.

5. Auswertung und Statistik

Auf die vorhergehend geschilderte Weise wurden alle im PRP und PPP enthaltenen Enzymaktivitäten und Substanzkonzentrationen gemessen und nach Bestimmung der Blutplättchenkonzentration in den verschiedenen PRP-Proben die Resultate jeweils auf den Einzel-Thrombozyt bzw. im Falle der Adeninnukleotide auf 10^{11} Plättchen bezogen. Bei diesem Bezug stellte das PRP-Resultat die maximal meßbare Gesamtkonzentration bzw. Aktivität (im Thrombozyten gespeichert + in das Plasma freigesetzt) dar. Durch die Bestimmungen im PPP wurde allein die pro Thrombozyt bzw. 10^{11} Blutplättchen in das Plasma freigesetzte Stoffmenge oder Enzymaktivität erfaßt. Durch Subtraktion beider Meßwerte voneinander ergab sich die in den Thrombozyten der jeweiligen PRP-Probe gespeicherte Konzentration bzw. Aktivität. Aus den pro Meßserie und Spezies bestimmten Einzelwerten wurden die im folgenden angegebenen Mittelwerte (durch Unterstreichung markiert) und Standardabweichungen vom Mittelwert (S.E.M.) errechnet.

Unter Verwendung des Kolmogoroff-Smirnoff-Tests wurde festgestellt, daß die Grundgesamtheit aller Einzelergebnisse einer Normalverteilung entsprach. Daher wurde zum statistischen Vergleich an die mit den Plasmaproben der zehn getesteten Mammalia gewonnenen Resultate der t-Test für ungepaarte Werte angelegt. Als Signifikanzniveau galt die 95%- ($p < 0{,}05$ = signifikant) bzw. 99,9%- ($p < 0{,}001$ = hoch signifikant) Grenze.

Ergebnisse

1. Aktivität der β-Glucuronidase

a) Messung mit der modifizierten Fishman-Methode

In einer ersten Serie von Experimenten wurde mit Hilfe des Substrates Phenolphthalein-β-glucuronid die enzymatische Aktivität von β-Glucuronidase in den PRP- und PPP-Proben der zehn verschiedenen Mammalia gemessen; die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Form von Säulendiagrammen in Abb. 6 dargestellt.

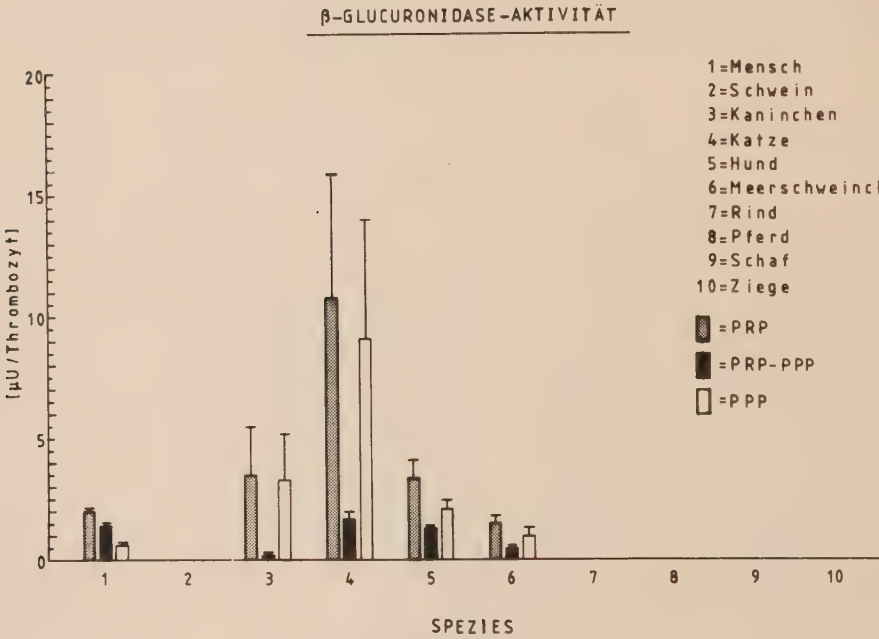

Abb. 6: Ergebnisse vergleichender kolorimetrischer Bestimmungen (Methode nach Fishman) der Aktivität von β-Glucuronidase (in µU/Thrombozyt) im PRP und PPP von zehn verschiedenen Spezies. Aus der Subtraktion der Aktivitäten in PRP und PPP ergab sich der intrathrombozytäre Enzymgehalt (schwarze Säulen). (Mittelwerte ± S.E.M.; Anzahl der Einzelbestimmungen s. Tab. I.) Die Aktivitätsangaben für das PPP beziehen sich auf das pro Thrombozyt freigesetzte Quantum.

Die höchste durchschnittliche Enzymaktivität fand sich mit 10,8 ± 5,2 µU im PRP der Katze, gefolgt von derjenigen beim Kaninchen (3,5 ± 2,0 µU), Hund (3,4 ± 0,7 µU), Mensch (2,0 ± 0,1 µU) und Meerschweinchen (1,5 ± 0,3 µU). Die Werte der Katze unterschie-

den sich damit von denjenigen des Hundes und des Menschen statistisch signifikant ($p < 0,05$ bzw. $< 0,02$). Andererseits lag die Enzymaktivität im Hundeplasma mit statistischer Signifikanz ($p < 0,01$) höher als diejenige beim Menschen und Meerschweinchen und die im Human-PRP wiederum signifikant ($p < 0,05$) über derjenigen beim Meerschweinchen. Nahezu identisch war die Reihenfolge bei der im PPP meßbaren Enzymaktivität; hier lagen ebenfalls die Enzymwerte der Katze mit im Mittel 9,1 ± 4,9 µU vor denen des Kaninchens (3,3 ± 1,9 µU), statistisch signifikant ($p < 0,05$) vor denen des Hundes (2,1 ± 0,4 µU) und denen des Meerschweinchens (1,0 ± 0,4 µU). Lediglich das Human-PPP fiel mit der niedrigsten Aktivität (0,6 ± 0,1 µU) aus der für das PRP aufstellbaren Hierarchie und unterschied sich dabei signifikant von der β-Glucuronidase-Aktivität des Katzen- und Kaninchen- ($p < 0,01$) und sogar statistisch hoch signifikant von der des Hunde-PPP ($p < 0,001$).

Die sich aus beiden Meßreihen nach Verrechnung mit der im PRP enthaltenen Plättchenzahl ergebende Rangfolge intrathrombozytären Enzymgehaltes sah wie folgt aus: mit 1,7 ± 0,3 µU enthielt das Katzenplättchen die höchste mittlere Enzymaktivität (statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber den Blutplättchen des Menschen und Kaninchens [$p < 0,03$]), während sich Human- (1,4 ± 0,1 µU) und Hundeplättchen (1,3 ± 0,1 µU) nicht wesentlich voneinander unterschieden. Dagegen war die durchschnittliche intrathrombozytäre β-Glucuronidase-Aktivität beim Meerschweinchen (0,5 ± 0,1 µU), bezogen auf das Katzenplättchen, dreifach und die des Kaninchenthrombozyten (0,2 ± 0,1 µU) achtfach geringer. Der Unterschied zwischen Katze und Kaninchen ist statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$).

Mit der Fishman-Methode ließen sich sowohl im PRP als auch im PPP von Schwein, Rind, Pferd, Schaf und Ziege keinerlei Aktivität von β-Glucuronidase nachweisen.

b) Messung mit der Methode nach Szasz (modifiziert)

Die zweite Serie von Versuchen benutzte das Substrat p-Nitrophenyl-β-glucuronid zum vergleichenden Nachweis der β-Glucuronidase-Aktivität (Abb. 7).

Erneut entwickelten die PRP-Proben von Katze (mit durchschnittlich 57,6 ± 24,3 U) und Kaninchen (40,3 ± 21,0 U) die höchste enzymatische Aktivität, gefolgt von Hund (11,7 ± 2,8 U) und Mensch (10,6 ± 2,3 U), dessen Ergebnis sich wiederum signifikant

($p < 0{,}03$) von demjenigen des Meerschweinchen-PRP ($\underline{10{,}3} \pm 1{,}5$ U) abhob. Mit Werten von $\underline{6{,}2} \pm 1{,}6$ U, $\underline{2{,}0} \pm 0{,}4$ U, $\underline{1{,}6} \pm 0{,}4$ U, $\underline{1{,}3} \pm 0{,}4$ U und $\underline{0{,}5} \pm 0{,}1$ U lagen die Enzymaktivitäten im PRP von Pferd, Ziege, Schaf, Rind und Schwein um 90 bis 99 % unter derjenigen des Katzen-PRP und damit auch signifikant ($p < 0{,}03$ bis $< 0{,}002$) unter der für Human-PRP festgestellten Aktivität.

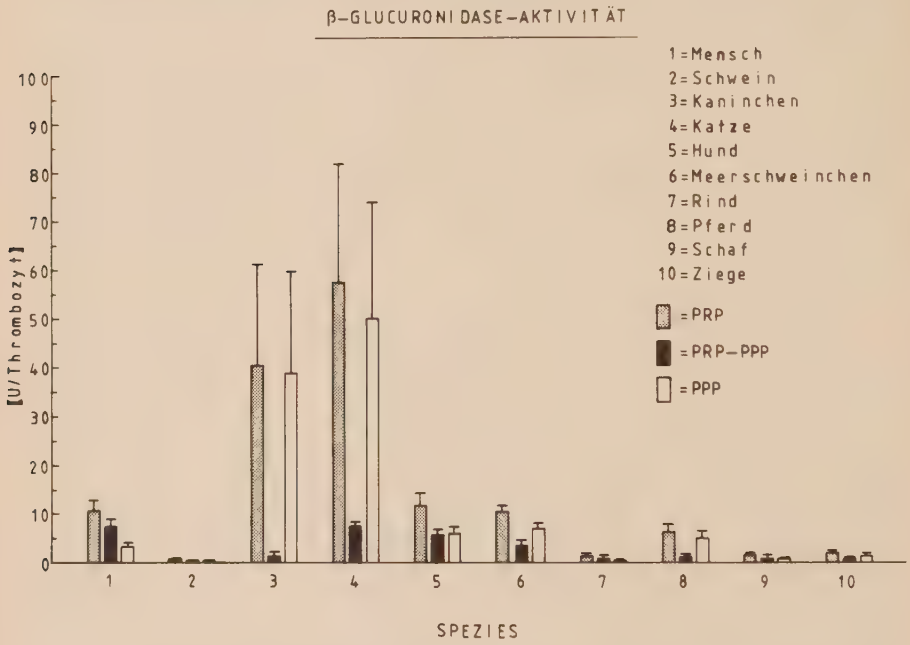

Abb. 7: Ergebnisse vergleichender kolorimetrischer Bestimmungen (Methode nach Szasz) der Aktivität von β-Glucuronidase (in U/Thrombozyt) im PRP und PPP von zehn verschiedenen Spezies. Aus der Subtraktion der Aktivitäten in PRP und PPP ergab sich der intrathrombozytäre Enzymgehalt (schwarze Säulen). (Mittelwerte ± S.E.M.; Anzahl der Einzelbestimmungen s. Tab. I.) Die Aktivitätsangaben für das PPP beziehen sich auf das pro Thrombozyt freigesetzte Quantum.

Eine annähernd gleiche Rangfolge ergab sich beim Enzymnachweis dieser Serie im PPP: Katzen- und Kaninchenproben enthielten mit im Mittel $\underline{50} \pm 24$ U bzw. $\underline{38{,}9} \pm 21$ U die höchste extrathrombozytäre β-Glucuronidase-Aktivität. Nur noch 10 % davon waren in Meerschweinchen- ($\underline{7{,}0} \pm 1{,}0$ U), Hunde- ($\underline{6{,}0} \pm 1{,}2$ U), Pferde- ($\underline{5{,}0} \pm 1{,}3$ U) und Humanproben ($\underline{3{,}2} \pm 0{,}7$ U), 2 % in Ziege- ($\underline{1{,}4} \pm 0{,}3$ U) und Schafproben ($\underline{0{,}7} \pm 0{,}2$ U) und 0,5 % der auf Katzen-PPP bezogenen Aktivität in den PPP-Proben von Rind ($\underline{0{,}4} \pm 0{,}1$ U) und Schwein ($\underline{0{,}3} \pm 0{,}1$ U) nachweisbar.

Aus dem für die jeweiligen PRP- und PPP-Proben festgestellten Enzymgehalt und der in den PRP-Proben befindlichen Blutplättchenkonzentration ergab sich, daß eine Gruppe, der die Katze (7,6 ± 0,7 U), der Mensch (7,4 ± 1,7 U), der Hund (5,7 ± 1,6 U) und das Meerschweinchen (3,3 ± 0,8 U) angehörten, die höchste durchschnittliche intrathrombozytäre β-Glucuronidase-Aktivität aufwies, während der mittlere thrombozytäre Enzymgehalt bei Kaninchen (1,4 ± 0,4 U), Pferd (1,2 ± 0,4 U), Rind (0,9 ± 0,5 U), Schaf (0,9 ± 0,3 U), Ziege (0,6 ± 0,3 U) und Schwein (0,2 ± 0,1 U) statistisch signifikant ($p < 0{,}03$ bis $< 0{,}001$) niedriger war.

2. Konzentration der Adeninnukleotide ATP, ADP und AMP

Eine weitere Untersuchungsserie war dem vergleichenden Nachweis der Adeninnukleotide ATP, ADP und AMP unter Verwendung der Firefly-Luciferase-Methode gewidmet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen, in Abb. 8 und 9 als Säulendiagramme wiedergegeben, dokumentieren, daß ATP und ADP fast ausschließlich im PRP, m. a. W. in den Blutplättchen anzutreffen war. Lediglich im PPP von Ziege und Schaf fand sich eine mittlere ATP-Konzentration von 7,6 ± 4,7 bzw. 1,1 ± 0,5 mg, in dem PPP von Katze und Schaf ein durchschnittlicher ADP-Spiegel von 2,2 ± 2,1 bzw. 0,9 ± 0,5 mg, alle Werte bezogen auf eine Plättchenzahl von 10^{11}.

Abb. 8 zeigt, daß Katzen- und Schweineplättchen mit 24,6 ± 8,5 und 23,9 ± 3,9 mg die größte ATP-Menge enthielten, gefolgt von einer Gruppe, der die Thrombozyten von Hund (16,7 ± 1,8 mg), Meerschweinchen (16 ± 2,5 mg), Pferd (14,6 ± 4,8 mg), Mensch (14,2 ± 1,8 mg) und Kaninchen (12,7 ± 1,4 mg) angehörten. Von diesen setzten sich, statistisch signifikant ($p < 0{,}05$), die durchschnittlichen ATP-Konzentrationen der Blutplättchen von Rind (10,1 ± 1,9 mg) und Ziege (9,5 ± 2,9 mg) ab. Mit 5,3 ± 0,6 mg wiesen die Schafsthrombozyten den im Vergleich zu allen übrigen signifikant niedrigsten ATP-Gehalt auf ($p < 0{,}05$ bis $< 0{,}002$).

Aufgrund der Biolumineszenz-Bestimmungen enthielten die Blutplättchen von Meerschweinchen (11 ± 2,9 mg) und Ziege (9,6 ± 1,9 mg) eine höhere Konzentration von ADP (Abb. 9) als diejenigen von Schwein (8,6 ± 0,5 mg), Mensch (7,7 ± 1,0 mg), Katze (7,1 ± 2,2 mg), Kaninchen (6,1 ± 1,6 mg), Rind (5,8 ± 1,4 mg), Pferd (5,1 ± 0,9 mg) und Schaf (4,8 ± 2,0 mg).

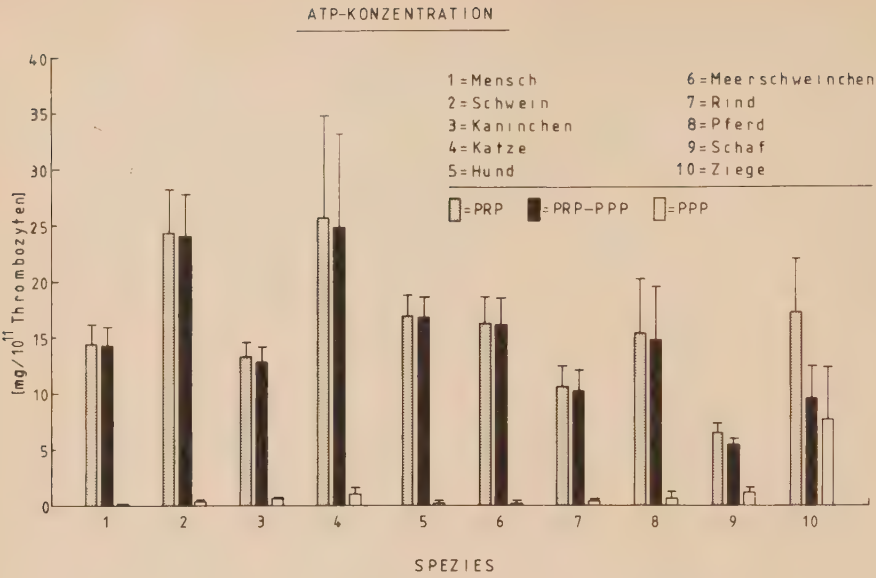

Abb. 8: Ergebnisse der vergleichenden Biolumineszenz-Bestimmungen von ATP (in mg/10^{11} Thrombozyten) im PRP und PPP von zehn verschiedenen Spezies. Aus der Subtraktion von PRP- und PPP-Gehalt ergab sich die intrathrombozytäre ATP-Konzentration (schwarze Säulen). (Mittelwerte ± S.E.M.; Anzahl der Einzelbestimmungen s. Tab. I.) Die Konzentrationsangaben für das PPP beziehen sich auf das pro 10^{11} Thrombozyten freigesetzte Quantum.

Von dieser Gruppe hob sich der für die Hundethrombozyten gefundene Wert (3,1 ± 0,7 mg) nochmals signifikant ab ($p < 0{,}05$ bis $< 0{,}001$).

Mit der Firefly-Luciferase-Technik ließ sich in keiner der getesteten Plättchenproben – immer nach entsprechender Phosphorylierung und in jeweils mindestens drei Kontrollen – ein Hinweis für das Vorhandensein von AMP (auch nur in Spuren) ausmachen.

In Abb. 10 ist das in den verschiedenen Medien (PRP, PPP und Thrombozyt) für die diversen Mammalia ermittelte Verhältnis von ATP- zu ADP-Gehalt aufgelistet. Die Säulendiagramme deuten auf den ersten Blick an, daß stes ATP in der jeweiligen Meßprobe höher konzentriert vorlag als ADP. So überwog der ATP-Spiegel im Hunde-PRP bzw. -Thrombozyten das ADP um mehr als das siebenfache und lag in den Proben vom Meerschweinchen, die die niedrigsten Nukleotid-Quotientenwerte für PRP und Thrombozyten überhaupt aufwiesen, immer noch 40 % höher.

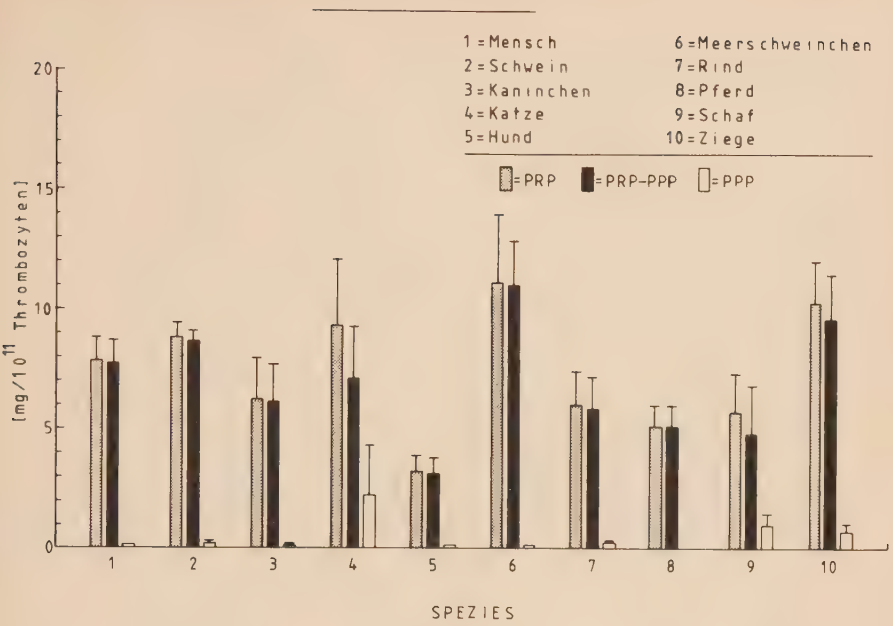

Abb. 9: Ergebnisse der vergleichenden Biolumineszenz-Bestimmungen von ADP (in mg/10^{11} Thrombozyten) im PRP und PPP von zehn verschiedenen Spezies. Aus der Subtraktion von PRP- und PPP-Gehalt ergab sich die intrathrombozytäre ADP-Konzentration (schwarze Säulen). (Mittelwerte ± S.E.M.; Anzahl der Einzelbestimmungen s. Tab. I.) Die Konzentrationsangaben für das PPP beziehen sich auf das pro 10^{11} Thrombozyten freigesetzte Quantum.

Abb. 10 läßt weiterhin erkennen, daß die intrathrombozytären und für PRP errechneten Nukleotid-Quotienten bei den Proben von Mensch, Schwein, Kaninchen, Meerschweinchen, Rind, Pferd und Schaf identisch hoch lagen, während bei Katze und Hund der intrathrombozytäre den Quotienten im PRP und bei der Ziege der PRP-Quotient denjenigen im Thrombozyten übertraf.

Bei den meisten Spezies lag der für das PPP errechnete ATP/ADP-Quotient deutlich unter demjenigen der anderen beiden Medien – im PPP vom Pferd war kein ADP nachweisbar. Lediglich beim Kaninchen, Rind und besonders bei der Ziege überwog das Verhältnis von ATP zu ADP im PPP dasjenige in den Blutplättchen.

Die beim Hund registrierten ATP/ADP-Quotienten im Thrombozyten und PRP rangierten mit statistischer Signifikanz ($p < 0{,}05$ bis $< 0{,}003$) über den Vergleichswerten bei den übrigen Säugetieren, die sich voneinander nicht mehr signifikant unterschieden.

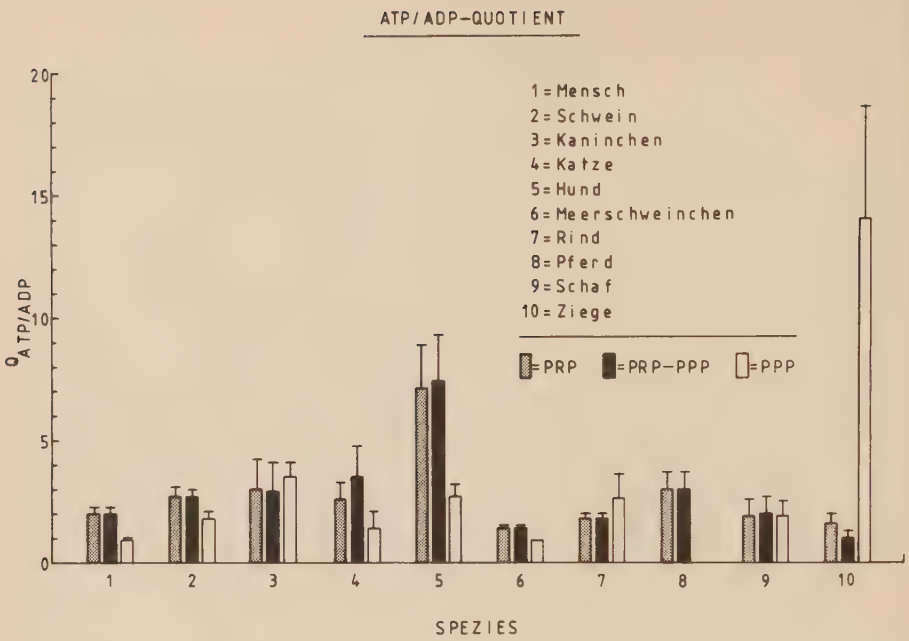

Abb. 10: Verhältnis von ATP- zu ADP-Gehalt.
Aus den Resultaten der ATP- und ADP-Analysen (Abb. 8 und 9) wurde für die verschiedenen Medien der jeweilige ATP/ADP-Quotient berechnet. (Mittelwerte ± S.E.M.; Anzahl der Einzelbestimmungen s. Tab. I.) Die Quotienten für das PPP beziehen sich auf das Verhältnis der pro 10^{11} Thrombozyten freigesetzten ATP- und ADP-Mengen.

3. Konzentrationen thrombozytenspezifischer Proteine

Anhand ausführlicher Vorversuchsreihen war festgestellt worden, daß zwei Tests, die die Antiheparinaktivität der thrombozytenspezifischen Proteine zu deren quantitativem Nachweis ausnutzen („Heparin-Thrombin-Gerinnungszeitverfahren" und „chromogener Substrat-Test"), zumindest für die vorgesehenen vergleichenden Studien ungeeignet waren. Daher wurde in einer letzten Serie versucht, in den Blutplättchen der verschiedenen Säugetiere den intrathrombozytären Gehalt an PF_4 und β-Tg mit Hilfe zweier Radioimmunoassays (RIA) zu quantifizieren.

a) Plättchenfaktor 4 (PF_4)

Mit einem RIA, der für die immunbiologische Bestimmung von Human-PF_4 entwickelt und hergestellt worden war, konnten lediglich in den Proben von Mensch, Katze und Kaninchen meßbare Konzentrationen dieses Proteins nachgewiesen werden (Abb. 11). Im Human-PRP fand sich, bezogen auf den Thrombozyten, eine durchschnittliche Konzentration von 52,0 ± 5,0 fg, wovon etwa 5 % (2,7 ± 0,4 fg) auf das Suspensionsmedium, das PPP, und 95 % (49,3 ± 4,4 fg) auf die zelluläre Phase, die Blutplättchen, entfielen. Das Katzen-PRP enthielt mit 52,5 ± 14,6 fg im Mittel die gleiche Menge an PF_4. Hier befand sich der Kardinalanteil des Proteins (47,5 ± 19,7 fg) jedoch im PPP und nur knapp 10 % (5,0 ± 5,0 fg) innerhalb der Thrombozyten. Mit 2,3 ± 0,8 fg war die PF_4-Konzentration im Kaninchen-PRP etwa 20-fach geringer als im Menschen- oder Katzen-PRP. Etwa 65 % des Kaninchen-PF_4 (1,5 ± 0,6 fg) befanden sich im PPP, 35 % (0,8 ± 0,2 fg) intrathrombozytär. In den Proben der übrigen sechs getesteten Säugetiere waren maximale PF_4-Mengen von 1 fg pro Thrombozyt nachweisbar, was an den Fehlerbereich der Bestimmungsmethode grenzt.

b) β-Thromboglobulin (β-Tg)

Von allen Meßproben der untersuchten Spezies enthielten ausschließlich diejenigen des Menschen β-Tg. Dieses Protein, im PRP in einer Konzentration von 121,8 ± 12,8 fg/Thrombozyt meßbar, befand sich zu 90 bis 98 % intrathrombozytär.

Einen Gesamtüberblick über die Resultate der vorliegenden Studie zur vergleichenden Bestimmung von β-Glucuronidase, Adeninnukleotiden und thrombozytenspezifischen Proteinen (jeweils Mittelwerte ± S.E.M.) mit den Plasmaproben von zehn verschiedenen Säugetieren sowie über die mittlere Plättchenzahl in den einzelnen PRP-Proben liefert Tab. VI.

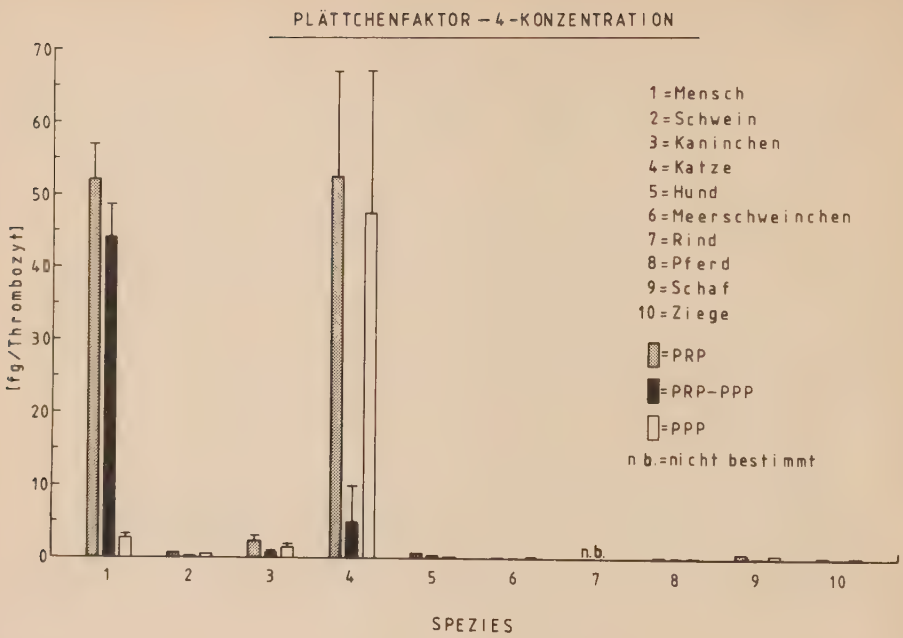

Abb. 11: Ergebnisse vergleichender radioimmunologischer Bestimmungen des Plättchenfaktor 4 (PF_4; in fg/Thrombozyt) im PRP und PPP von neun verschiedenen Spezies. Aus der Subtraktion von PRP- und PPP-Konzentration ergab sich der intrathrombozytäre PF_4-Gehalt (schwarze Säulen). (Mittelwerte ± S.E.M.; Anzahl der Einzelbestimmungen s. Tab. I.) Die Konzentrationsangaben für das PPP beziehen sich auf das pro Thrombozyt freigesetzte Quantum.

Tab. VI: Zusammenfassung aller im PRP und PPP von zehn verschiedenen Säugetieren gemessenen Parameter sowie der mittleren Thrombozytenzahlen der PRP-Proben (X 10^3/µl PRP).
(Mittelwerte ± S.E.M.; Anzahl der pro Spezies untersuchten Individuen s. Tab. I)
(THR ≙ intrathrombozytär; n.b. ≙ nicht bestimmt; ∅ ≙ nicht berechenbar)

		β-Glucuronidase						Adeninnukleotide									Thr.-Spez.-Protein		
	Thrombozyten-zahlen im PRP (Mittelwerte X 10^3/µl PRP)	I modifizierte Fishmann-Methode µU pro Thrombozyt			II modifizierte Szasz-Methode U pro Thrombozyt			ATP			ADP			ATP/ADP-Quotient			PF_4 RIA fg pro Thrombozyt		
								Firefly-Luciferase-Methode mg/10^{11} Thrombozyten											
SPEZIES		PRP	THR	PPP	PRP	THR	PPP	PRP	THR	PPP	PRP	THR	PPP	PRP	THR	PPP	PRP	THR	PPP
Mensch	195	2,0 (±0,1)	1,4 (±0,1)	0,6 (±0,1)	10,6 (±2,3)	7,4 (±1,7)	3,2 (±0,7)	14,3 (±1,8)	14,2 (±1,8)	0,1 (±0,0)	7,8 (±1,0)	7,7 (±1,0)	0,1 (±0,0)	2,0 (±0,3)	2,0 (±0,3)	0,9 (±0,1)	52,0 (±5,0)	49,3 (±4,4)	2,7 (±0,4)
Schwein	160	0	0	0	0,5 (±0,1)	0,2 (±0,1)	0,3 (±0,1)	24,2 (±4,0)	23,9 (±3,9)	0,3 (±0,1)	8,8 (±0,6)	8,6 (±0,5)	0,2 (±0,1)	2,7 (±0,4)	2,7 (±0,4)	1,8 (±0,3)	0,7 (±0,1)	0,2 (±0,1)	0,5 (±0,1)
Kaninchen	107	3,5 (±2,0)	0,2 (±0,1)	3,3 (±1,9)	40,3 (±21,0)	1,4 (±0,4)	38,9 (±21,0)	13,2 (±1,3)	12,7 (±1,4)	0,5 (±0,2)	6,2 (±1,7)	6,1 (±1,6)	0,1 (±0,1)	3,0 (±1,2)	2,9 (±1,2)	3,5 (±0,6)	2,3 (±0,8)	0,8 (±0,2)	1,5 (±0,6)
Katze	90	10,8 (±5,2)	1,7 (±0,3)	9,1 (±4,9)	57,6 (±24,3)	7,6 (±0,7)	50,0 (±24,0)	25,6 (±9,1)	24,6 (±8,5)	1,0 (±0,6)	9,3 (±2,8)	7,1 (±2,2)	2,2 (±2,1)	2,6 (±0,7)	3,5 (±1,3)	1,4 (±0,7)	52,5 (±14,6)	5,0 (±5,0)	47,5 (±19,7)
Hund	97	3,4 (±0,7)	1,3 (±0,1)	2,1 (±0,4)	11,7 (±2,8)	5,7 (±1,6)	6,0 (±1,2)	16,8 (±1,9)	16,7 (±1,8)	0,1 (±0,1)	3,2 (±0,7)	3,1 (±0,7)	0,1 (±0,0)	7,1 (±1,8)	7,4 (±1,9)	2,7 (±0,5)	0,8 (±0,1)	0,4 (±0,1)	0,3 (±0,1)
Meerschweinchen	180	1,5 (±0,3)	0,5 (±0,1)	1,0 (±0,4)	10,3 (±1,5)	3,3 (±0,8)	7,0 (±1,0)	16,1 (±2,4)	16,0 (±2,5)	0,1 (±0,1)	11,1 (±2,9)	11,0 (±2,9)	0,1 (±0,0)	1,4 (±0,1)	1,4 (±0,1)	0,9 (±0,0)	0,1 (±0,0)	0,0 (±0,0)	0,1 (±0,0)
Rind	100	0	0	0	1,3 (±0,4)	0,9 (±0,5)	0,4 (±0,1)	10,5 (±1,9)	10,1 (±1,9)	0,4 (±0,1)	6,0 (±1,4)	5,8 (±1,4)	0,2 (±0,1)	1,8 (±0,2)	1,8 (±0,2)	2,6 (±1,0)	n.b.		
Pferd	53	0	0	0	6,2 (±1,6)	1,2 (±0,4)	5,0 (±1,3)	15,2 (±4,9)	14,6 (±4,8)	0,6 (±0,6)	5,1 (±0,9)	5,1 (±0,9)	0	3,0 (±0,7)	3,0 (±0,7)	∅	0,4 (±0,0)	0,2 (±0,0)	0,2 (±0,0)
Schaf	107	0	0	0	1,6 (±0,4)	0,9 (±0,3)	0,7 (±0,2)	6,4 (±0,8)	5,3 (±0,6)	1,1 (±0,5)	5,7 (±2,1)	4,8 (±2,0)	0,9 (±0,5)	1,9 (±0,7)	2,0 (±0,7)	1,9 (±0,6)	0,8 (±0,2)	0,2 (±0,1)	0,6 (±0,2)
Ziege	42	0	0	0	2,0 (±0,4)	0,6 (±0,3)	1,4 (±0,3)	17,1 (±4,8)	9,5 (±2,9)	7,6 (±4,7)	10,3 (±1,8)	9,6 (±1,9)	0,7 (±0,3)	1,6 (±0,4)	1,0 (±0,3)	14,0 (±4,6)	0,4 (±0,0)	0,1 (±0,0)	0,3 (±0,0)

Diskussion

1. Beurteilung der Ergebnisse der biochemischen Analysen unter Berücksichtigung der zur Meßprobenherstellung notwendigen Versuchsbedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Gehalt chemisch und funktionell so unterschiedlicher Substanzen wie Adeninnukleotide, plättchenspezifische Proteine und eines lysosomalen Enzyms in den Thrombozyten verschiedener Säugetiere vergleichend untersucht. Damit sollte u. a. nach Hinweisen zur Erklärung früher beobachteter thrombozytärer Reaktionsunterschiede (131) bei einigen der Mammalia gefahndet werden. Da ganz allgemein in den letzten Jahren die bedeutende Rolle der Blutplättchen bei einer ganzen Reihe von Stoffwechsel- und Herzkreislaufkrankheiten erkannt worden ist, wurde eine Vielzahl von Methoden zur Quantifizierung von Thrombozyteninhalt und -funktion entwickelt. Die meisten dieser Meßtechniken benutzen als Vorlage die von den übrigen zellulären Blutbestandteilen abgetrennten Plättchen. Schon aus praktischen Erwägungen wurde für die vorliegende Studie von den diversen Zellisolationsmethoden die der Differentialzentrifugation ausgewählt, bei der aus Citratblut PRP hergestellt wird. Dieses Verfahren erschien vergleichsweise wenig aufwendig, die Plättchen verblieben bis zum Aufschluß in ihrem natürlichen Milieu und kamen nur in geringem Maße mit fremden Oberflächen in Kontakt.

Zur vergleichenden Kontrolle des intrathrombozytär-chemischen Status wurden Substanzen ausgewählt, von denen (zumindest beim Menschen) bekannt war, daß sie: a) unter physiologischen Verhältnissen, wenn überhaupt, dann nur, in geringer Konzentration im Plasma vorliegen, b) im Thrombozyten an verschiedenen Orten gelagert sind und c) bei Reizung der Blutplättchen an das umgebende Medium freigesetzt werden können, ähnlich der Ausschüttung der Wirkstoffe aus Zellen endokriner Drüsen (125). Bei diesem zuletzt genannten Vorgang, der nach Grette (41) als „release reaction" bezeichnet wird, sollen Art und Stärke des Reizes bestimmen, welche intrathrombozytären Substanzen in welchem Umfang ausgeschleust werden (49).

Die eigentliche, physiologische Bedeutung dieser Substanzen, der nicht-metabolischen, in sog. „Dense Bodies" gespeicherten Adeninnukleotide, der β-Glucuronidase, des PF_4 und des β-Tg, ist bis heute noch ungeklärt.

Bei dem für die vorliegenden Studien ausgewählten analytischen Vorgehen – der Bestimmung der jeweiligen intrathrombozytären Substanzkonzentration aus den Meßdaten im zellreichen und -freien Suspensionsmedium (PRP bzw. PPP) – fiel zunächst einmal der bei einzelnen Spezies teilweise recht hohe extrathrombozytäre Gehalt, besonders an β-Glucuronidase und PF_4, bei Ziege, Schaf und Katze auch an ATP bzw. ADP auf (Abb. 12).

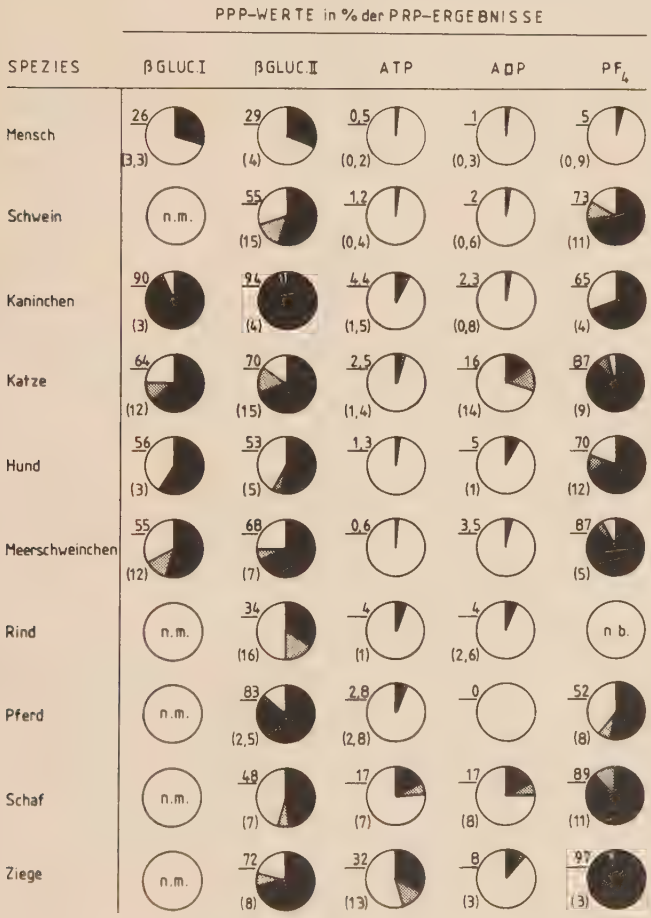

Abb. 12: Anteil der im PPP nachzuweisenden β-Glucuronidase-Aktivität (I: modifizierte Fishman-Methode; II: modifizierte Szasz-Methode), des ATP-, ADP- und PF_4-Gehalts in % der jeweiligen PRP-Konzentration. Mittelwerte (schwarze Kreissektoren, unterstrichene Zahlen) und S.E.M. (schraffierte Kreissektoren, eingeklammerte Zahlen) (n. b. ≙ nicht bestimmt; n. m. ≙ nicht meßbar; Anzahl der Einzelmessungen s. Tab. I).

Nun könnte einerseits angenommen werden, die plasmatische Grundkonzentration der genannten Substanzen sei bei einigen Spezies höher als bei anderen. Dies ist jedoch, zumindest was den PF_4 anbetrifft, unwahrscheinlich. Andererseits könnten die hohen plasmatischen β-Glucuronidase-Spiegel durch eine Lyse von Leukozyten, die das vierfache der normalerweise im Plasma befindlichen Enzymaktivitäten enthalten (106), bei der Blutentnahme und Herstellung von PRP bzw. PPP zustande gekommen sein. In diesem Falle hätten aber gleichzeitig auch die extrathrombozytären Adeninnukleotid-Konzentrationen hoch sein müssen, was bei den meisten Proben nicht zutraf (Abb. 12). Ähnliches gilt für eine Zytolyse der roten Blutkörperchen, in denen im übrigen eine β-Glucuronidase-Aktivität überhaupt nicht nachgewiesen werden konnte (106).

Da die Thrombozyten bereits bei der Blutentnahme und dann bei der anschließenden Zentrifugation einer Vielzahl von Reizen ausgesetzt sind (74, 76, 151), bleibt zur Erklärung der erwähnten Beobachtung letztlich also nur die bei der Probenherstellung provozierte Freisetzung der intrathrombozytär gespeicherten Substanzen. Berücksichtigt man nun, daß alle Plättchenproben identisch präpariert worden waren, so lassen die in Abb. 12 zusammengefaßten Befunde vermuten, daß die Thrombozyten bzw. ihre Substrukturen bei den verschiedenen Spezies in unterschiedlichem Ausmaß fragil sind oder daß sich eine Freisetzungsreaktion der Plättchen leichter induzieren läßt. Humanthrombozyten scheinen in dieser Hinsicht am resistentesten zu sein.

In den in Abb. 12 dargestellten Versuchsserien zeigte sich, daß jedesmal der Anteil der extrathrombozytären β-Glucuronidase an der im PRP nachgewiesenen Gesamtaktivität den Vergleichswert der Adeninnukleotide weit übertraf. Dies scheint allerdings einer Beobachtung von Holmsen (52) zu widersprechen, wonach bei der „release reaction" zunächst die Adeninnukleotide, erst dann die lysosomalen Enzyme liberalisiert werden sollen.

2. Aktivität der thrombozytären β-Glucuronidase

Beide angewandten kolorimetrischen Bestimmungsmethoden zählen zu den klassischen Nachweisverfahren, die in den meisten bislang veröffentlichten Studien zur Erfassung der β-Glucuronidase-Aktivität in biologischen Medien benutzt wurden. Für die Fra-

gestellung der vorliegenden Arbeit mußten die Techniken aber – vor allem wegen der notwendigen vollständigen Thrombozytolyse – modifiziert werden.

Die β-Glucuronidase gehört zu den Glykosidasen, einer Untergruppe der sauren Hydrolasen, und katalysiert die Hydrolyse von β-Glucuroniden sowie die Übertragung von Glucuronylresten auf Akzeptoralkohole. Da vermutet werden kann, daß dieses Enzym bei verschiedenen Spezies in unterschiedlichen molekularen Formen vorhanden sein kann, also ein Isoenzym darstellt, war u. a. zu überprüfen, ob die Höhe der Resultate und der positive Enzymnachweis überhaupt von bestimmten Meßbedingungen, wie z. B. dem pH-Wert des Inkubationsansatzes, abhängen.

a) Vorversuche zu den ausgewählten Enzym-Bestimmungsmethoden

Zur Prüfung der Abhängigkeit der Resultate von verschiedenen Meßbedingungen waren mehrere Vorversuchsreihen notwendig. In einer ersten Serie wurde der Effekt dreier unterschiedlicher Antikoagulantien auf den Enzymnachweis mit der Fishman- bzw. Szasz-Methode getestet. [1. Na-Citrat-Lösung (3,8 %-ig), 2. EDTA (2 %-ig, pH 7,3) bei 1. und 2. Endvolumenverhältnis Antikoagulans : Blut = 1 : 10, 3. Heparin-Na (Liquemin® 20 000) 50 µl auf 10 ml Blut.] Die Aktivität der β-Glucuronidase soll nach den Beobachtungen von Levvy (72) und Verity (135) durch Citrat, besonders bei pH-Werten < 5, nach Berichten von Cajuni (12) und Wong (148) durch Heparin meßbar eingeschränkt werden. In den Pilotstudien der vorliegenden Arbeit konnte jedoch festgestellt werden, daß zumindest bei dem beschriebenen methodischen Vorgehen sich die Ergebnisse, die mit den unterschiedlich antikoagulierten Plasmen erzielt wurden, nicht signifikant voneinander abhoben.

Eine zweite Vorversuchsserie beschäftigte sich mit dem Einfluß dreier verschiedener Arten der Thrombozytolyse auf die Höhe der Enzymaktivität. Es zeigte sich, daß diese bei der Zerstörung der Zellhüllen – Plasmalemm sowie Zytomembran der Lysosomen – (zum Zwecke der vollständigen Freisetzung der β-Glucuronidase) sowohl durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen als auch durch Ultraschallbehandlung der PRP-Proben keine Änderung erfuhr. Die Vorbehandlung der Proben mit 1 %-igem Triton X 100 (untersuchte Endkonzentrationen im Testansatz: 0,2, 0,1 und 0,05 %), einem Polyoxyäthylen-Äther, das in der Biochemie häufig zum Zellaufschluß verwendet wird, hatte deutlich niedriger meß-

bare Enzymaktivitätswerte zur Folge. Diese Beobachtung stand im Widerspruch zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (135, 149), die für Triton X 100 eine enzymaktivierende Wirkung beschrieben haben.

In einer dritten Vorversuchsreihe wurde in Verbindung mit den soeben beschriebenen Thrombozytolysetechniken getestet, ob die Inkubationsbedingungen, die von den Erstautoren der benutzten Nachweismethoden angegeben worden sind (32, 127), auch das Optimum für das vorgesehene Projekt darstellten. Dabei ergab sich, daß mit beiden Substraten maximale Enzymaktivitäten erzielt wurden, wenn die von den Erstbeschreibern empfohlenen Temperaturen, bei der die Meßansätze inkubiert werden sollten, um gut 50% erhöht, die Inkubationsdauer gleichzeitig um 60% verkürzt wurde. Um den pH-Wert der Meßproben über die gesamte Inkubationsdauer konstant zu halten, mußte bei der Fishman-Methode die Molarität des zuzusetzenden Acetatpuffers erhöht werden. Bei der Untersuchung der Frage, ob die β-Glucuronidase der verschiedenen Spezies zu ihrem Nachweis einen Spezies-spezifischen pH-Wert des Testansatzes benötige, stellte sich dann heraus, daß für die Plasmaproben aller getesteten Mammalia das pH-Optimum der Enzymreaktion bei 4,5 (Fishman-Methode) bzw. 4,0 (Szasz-Methode) lag.

Die zweifelsohne wichtigste Voraussetzung für die vorgesehenen vergleichenden Studien war, daß die verwendeten Meßtechniken reproduzierbare Ergebnisse und quantitativ mit der Plättchenzahl korrelierende Enzymaktivitäten lieferten. Eine letzte Reihe von Vorversuchen konnte dies unter Verwendung der Thrombozyten aller zehn Spezies bestätigen. Der β-Glucuronidasegehalt wurde mit beiden Techniken in PRP-Proben, die zuvor mit autologem PPP schrittweise verdünnt worden waren, bestimmt und die gefundenen Aktivitäten in einem Diagramm gegen die jeweiligen Plättchenzahlen aufgetragen; in den diluierten Ansätzen waren die Enzymaktivitäten der jeweiligen Blutplättchenkonzentration direkt proportional.

b) Ergebnisse der vergleichenden β-Glucuronidasebestimmungen

Die Resultate der vorliegenden Studie dokumentieren, daß in den Thrombozyten von Mensch, Kaninchen, Katze, Hund und Meerschweinchen das lysosomale Enzym β-Glucuronidase in unterschiedlicher Aktivität nachweisbar war, während es beim Versuch

des Nachweises mit der modifizierten Fishman-Methode in den Plasmaproben von Schwein, Rind, Pferd, Schaf und Ziege vollständig zu fehlen und in den gleichen Medien dieser Spezies mit der Szasz-Technik nur in Spuren antreffbar zu sein schien. Selbst bei Messungen in Plättchenkonzentraten, die etwa das 10-fache der im PRP bestimmten Thrombozytenzahlen enthielten, konnte bei den genannten fünf Tierarten keine bemerkenswerte thrombozytäre Enzymaktivität nachgewiesen werden. Dieser Befund könnte einerseits auf einem enzyminhibierenden Effekt des Substrats beruhen, der Phenolphthalein-β-glucuronid bereits von anderen Arbeitsgruppen zugeschrieben worden ist (100). Um dieser Frage nachzugehen, wurde die 0,03 M Phenolphthalein-β-glucuronid-Lösung mit 0,2 M Na-Acetatpuffer (pH 4,5) verdünnt und bei den genannten fünf Spezies Versuchsserien mit 0,02 M, 0,01 M und 0,006 M Substratlösungen durchgeführt, abermals ohne meßbaren Erfolg. Dies war insofern aber auch nicht zu erwarten, da nach Fishman (32) die Serum-β-glucuronidase eine hohe Michaeliskonstante besitzt und somit zu ihrer Bestimmung von vorneherein hohe Substratkonzentrationen notwendig sind.

Andererseits könnte eine spezielle plasmatische Hemmsubstanz für den fehlenden Nachweis einer β-Glucuronidase-Aktivität im PRP und PPP von Schwein, Rind, Pferd, Schaf und Ziege verantwortlich gemacht werden. Altman und Springer (2) hatten eine Anti-Glucuronidase-Aktivität bereits 1948 in humanem Plasma beobachtet. Nach Levvy und Marsh (72) besitzt Saccharo-1,4-lacton, eine Substanz, die auch im Blut des Menschen vorhanden sein soll, einen spezifischen β-Glucuronidase-Hemmeffekt. Die Existenz eines solchen Inhibitors im Plasma der genannten Tiere bzw. seine Aktivierung durch das benutzte Substrat wäre also als weitere Erklärung für den beschriebenen Sachverhalt heranzuziehen.

Bisher fehlen in der zur Verfügung stehenden Literatur vergleichbare Daten über den thrombozytären β-Glucuronidasegehalt bei den untersuchten Mammalia. Nur über die Aktivität dieses Enzyms in Humanthrombozyten ist eine einzige Studie veröffentlicht worden (24), wobei jedoch unterschiedliches methodisches Vorgehen und Art der Enzymaktivitätsangabe einen direkten Vergleich ausschließen. Miller und Mitarbeiter (82) bestimmten die β-Glucuronidase-Aktivität im Serum sechs verschiedener Säugetiere. Danach finden sich bei Hund und Katze relativ hohe, bei Meerschweinchen und Kaninchen mittlere und bei Mensch und Schwein sehr geringe Werte. Legt man diese Resultate an die

Ergebnisse der eigenen Untersuchungen im PRP der zitierten Spezies an, so zeigt sich, daß offenbar deutliche Differenzen zwischen der Enzymaktivität im Serum und derjenigen in den Thrombozyten herrschen. Zu einem ähnlichen Schluß gelangten bereits Dohrmann und Klesper (24) nach Studien an Humanthrombozyten.

Die Bedeutung, die die lysosomalen Enzyme im Rahmen physiologischer, intrathrombozytär sich abspielender Vorgänge im einzelnen einnehmen, ist bisher weitgehend ungeklärt. Die Frage, welche Rolle die β-Glucuronidase nach ihrer Freisetzung aus den Thrombozytenspeichern im Extrazellularraum spielen könnte, ist augenblicklich auch nur spekulativ zu beantworten. Bei Gefäßwandprozessen im Sinne einer Arteriosklerose, deren Ursache ja seit Jahrzehnten Gegenstand intensivster Forschung ist, wird in einem erhöhten Plasma- bzw. Serum-β-glucuronidase-Spiegel einerseits eine pathogenetische, andererseits jedoch eine pathoprotektive Rolle gesehen. Nach dem heutigen Stand der Forschung sind jedenfalls die Blutplättchen eng mit dem Ablauf der Arteriosklerose verknüpft. Daneben haben sich drei weitere für die Atherogenese bedeutsame Faktoren herauskristallisiert (20): die Lipoproteine, der Endothelschaden und die Proliferation glatter Gefäßwandmuskelzellen. Der letzte Mechanismus soll durch eine mitogene Substanz provoziert bzw. ganz wesentlich gefördert werden (112), die als „Platelet Derived Growth-Factor" (PDGF) beschrieben wird; PDGF ist normalerweise in den sog. α-Granula der Blutplättchen gespeichert (147). Nach der „Response to Injury"-Hypothese fördert der PDGF, der aus Thrombozyten liberalisiert wird, die am Subendothel einer Gefäßwandläsion haften, die Proliferation der Gefäßwandmuskulatur, steigert die Rezeptoraffinität dieser Zellen für „Low Density Lipoproteins" (LDL) und unterstützt eventuell dadurch deren Infiltration mit Lipiden (112, 123). Somit könnte dieser PDGF ein Bindeglied zwischen den einzelnen genannten atherogenetisch wirksamen Faktoren darstellen. Auch durch Tierexperimente wurde die Beteiligung der Blutplättchen an der Pathogenese der Arteriosklerose aufgedeckt (35). Während Schweine allgemein als besonders anfällig gegenüber solchen pathologischen Veränderungen der Gefäßwand gelten, zeigten Tiere dieser Spezies mit einem „von Willebrand-Jürgens-Syndrom" eine Arterioskleroseresistenz (35). Diese autosomal dominant vererbliche, meist milde Blutgerinnungsstörung beruht auf der Existenz eines abnormen Gerinnungsfaktors VIII, der normalerweise nach einer Endothelläsion

für die Adhäsion von Blutplättchen am subendothelialen Gewebe unbedingt notwendig zu sein scheint (112).

Dyrbye und Kirk (26) wiesen nun erstmals in arteriosklerotisch veränderten Arterien des Menschen eine gesteigerte β-Glucuronidase-Aktivität nach, ein Befund, der auch von anderen Arbeitsgruppen (9, 64, 81) bestätigt und tierexperimentell gesichert werden konnte. Bei Kaninchen fand sich nach diätetisch hervorgerufener Arteriosklerose ein erhöhter β-Glucuronidasegehalt in den betroffenen Arterien (90). Im gleichen Sinne sind Beobachtungen zu interpretieren, nach denen eine koronare Herzkrankheit (84) oder ein Diabetes mellitus (25, 83) häufig von erhöhten Serum-β-glucuronidase-Spiegeln begleitet ist. Eine gedankliche Verbindung zwischen dem erhöhten Serum-Enzymgehalt und der sich an der Gefäßwand manifestierenden Erkrankung ergab sich durch die Studien von Kuzuya und Oguri (68), nach denen β-Lipoprotein (LDL) und Fibrinogen die Serum-β-glucuronidase zu aktivieren vermögen. In dem Enzym wurde folglich eine Mediatorsubstanz für die Arterioskleroseentwicklung gesehen.

In eine konträre Richtung gehen die Vermutungen von Kayahan (63), der in der Intima arteriosklerotischer Aorten des Menschen sowie im Serum von Arteriosklerotikern β-Glucuronidase-Aktivitäten bestimmte, die gegenüber den Werten eines Normalkollektivs signifikant reduziert waren. In derselben Publikation wird über Tierversuche berichtet, bei denen Hühner mit Arteriosklerose-fördernder Diät gefüttert worden waren. Wurde den Tieren gleichzeitig β-Glucuronidase injiziert, nahm die bei den Kontrollexperimenten registrierbare Lipämie und Cholesterinämie ab, das Blut wechselte von Hyper- zu Hypokoagulabilität. Kayahan schloß daraus, daß der β-Glucuronidase eher eine protektive bzw. präventive Bedeutung im Rahmen der Arterioskleroseentstehung zukäme.

Schlüsselt man die in der vorliegenden Arbeit als Testobjekte herangezogenen Säugetiere nach der Häufigkeit auf, in der bei ihnen eine „spontan auftretende" Arteriosklerose diagnostiziert werden kann, so führen Mensch und Schwein zweifelsohne die Skala an (33, 40, 92, 107, 110, 113). Beim Kaninchen ist eine solche Krankheit, wie erwähnt, experimentell durch eine cholesterinreiche Diät auszulösen (90), kommt spontan jedoch nur selten vor (45). Ebenso gering ist das Erkrankungsrisiko bei Meerschweinchen, Rind, Pferd, Schaf und Ziege (146), während Katze und Hund normalerweise als nahezu resistent gegenüber arteriosklerotischen

Gefäßwandveränderungen betrachtet werden (111, 128). Ein Versuch, diese recht summarische Rangfolge mit den Resultaten der vorliegenden Studie in Verbindung zu setzen, deutet eine inverse Korrelation zwischen Arteriosklerose anfälligkeit und der Höhe der in den Plasmaproben meßbaren β-Glucuronidase-Aktivität an. Das Hausschwein, dessen Erkrankungsdisposition und Krankheitsverlauf wohl am ehesten mit der Humanpathologie übereinstimmt (33, 113), hatte im Vergleich den absolut niedrigsten intrathrombozytären β-Glucuronidasegehalt, Katzen-, Kaninchen- und Hundethrombozyten hingegen entwickelten die höchsten Enzymaktivitäten. Somit scheinen die vorliegenden vergleichenden Untersuchungen die von Kayahan geäußerte Vermutung zu stützen, daß die β-Glucuronidase der Entwicklung arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen entgegenwirkt.

Die Mechanismen einer solchen Schutzfunktion könnten mit der biochemischen Potenz des Enzyms erklärt werden. Es wäre denkbar, daß die sauren Mucopolysaccharide – Substanzen, die an der Entstehung arteriosklerotischer Plaques in der Gefäßwand beteiligt sind (80) – durch die β-Glucuronidase enzymatisch abgebaut werden (64). Andererseits könnte das aus den Blutplättchen freigesetzte lysosomale Enzym durch eine Hemmung der Blutgerinnung – im wesentlichen auf der Ebene der Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin (65) – das Entstehen gefäßwandständiger Thromben verhindern helfen und dort die Entwicklung arteriosklerotischer Veränderungen erschweren. Aus allem Gesagten ergibt sich, daß weitere Abklärungen zu diesem Problemkomplex durchaus auch einen wertvollen Beitrag zur Therapie von Kreislaufkrankheiten leisten könnten.

3. Ergebnisse der vergleichenden Adeninnukleotid-Bestimmungen

Von allen intrathrombozytär lokalisierten Substanzen sind die Adeninnukleotide bisher am intensivsten untersucht worden. Durch Studien von Rozenberg und Holmsen (114) konnte dem ADP und ATP jeweils eine Schlüsselposition bei einer der Kardinalfunktionen der Blutplättchen zugeschrieben werden, nämlich der Bildung eines Aggregates zum Zwecke der frühen Blutstillung. Dabei wirkt ADP aggregationsauslösend, ATP hemmt kompetitiv diese Reaktion. Der eigentliche Mechanismus dieses Vorgangs konnte bis heute jedoch nicht restlos abgeklärt werden.

Eine Zusammenstellung bisher publizierter Daten zum Adeninnukleotid-Gehalt von Humanthrombozyten (Tab. VII) zeigt, daß die entsprechenden Ergebnisse der vorliegenden Studie hinsichtlich des ATP-Gehalts um das 3 – 6,4-fache, des ADP-Gehalts um das 3,8 – 7,5-fache über denjenigen der meisten zitierten Autoren lagen. Lediglich die Arbeitsgruppe um Schmitz (119) fand ähnlich hohe ATP-Konzentrationen in Humanplättchen. Die Diskrepanzen könnten auf unterschiedlichem methodischem Vorgehen beruhen, wobei den Differenzen in der Präparation der Meßvorlagen das größte Gewicht zuzuschreiben ist; die voneinander abweichenden Nachweistechniken dürften von untergeordneter Bedeutung sein. Durch das Gefrieren sedimentierter, gepackter Thrombozyten (42) wird zwar deren auch in vitro weiter ablaufender Stoffwechsel und damit ihr Energieverbrauch (ATP-Umsatz) gebremst. Andererseits scheint aber einmaliges Gefrieren und Auftauen nicht alle Zytomembranen vollständig zu zerstören, wie es für die selbstgewählte dreiminütige Inkubation des in Tris-EDTA-Puffer suspendierten PRP bei 98°C nachgewiesen werden konnte. Neben einem unvollständigen Zellaufschluß könnte als Ursache der auffälligen Konzentrationsunterschiede auch die bei einigen Nachweistechniken vorgenommene Abzentrifugation der Proteine vor der Äthanolextraktion lysierter Blutplättchen in Frage kommen, durch die wahrscheinlich relativ große Nukleotidmengen der Analyse entzogen werden (86).

Nach Holmsen (48, 51) lassen sich die intrathrombozytären Adeninnukleotide beim Menschen in drei Kompartimente aufteilen: 60 % der Gesamtnukleotide machen den „nicht-metabolischen Pool" aus, der nicht für den Zellstoffwechsel zur Verfügung steht und in sog. „Dense Bodies" – Thrombozytenorganellen, die sich durch eine besondere Elektronendichte von den übrigen unterscheiden – gespeichert bzw. aus diesen nach adäquater Stimulation freisetzbar ist. 30 % sollen dem „metabolischen Pool" angehören, d. h. dem im Stoffwechsel benutzten Nukleotidkompartiment, die restlichen 10 % als Energiequelle für die Freisetzung der nichtmetabolischen Nukleotide dienen. Somit wäre es durchaus denkbar, daß die anderen in Tab. VII aufgeführten Arbeitsgruppen bei ihren im Vergleich zu den eigenen Resultaten im allgemeinen wesentlich niedrigeren Ergebnissen nicht alle Nukleotidkompartimente erfaßt haben.

Tab. VII: Übersicht über die Ergebnisse (Mittelwerte) bisher veröffentlichter Adeninnukleotid-Bestimmungen an Humanthrombozyten

AUTOR	Adeninnukleotid-Konzentration (µmol/10^{11} Plättchen) ATP	ADP	AMP	ATP/ADP Quotient	Nachweis-methode	Untersuchungs-material
Gross, R. et al. (42)	4,5	2,5	2,8	1,8	A	$HClO_4$-Extrakte gefriergestoppter Plättchensedimente
Gross, R. et al. (42)	6,0	2,5	2,8	2,4	B	
Gross, R. et al. (42)	4,7	2,6	1,9	1,8	C	
Schmitz, H. et al. (119)	23,6	4,7	0,1	5,0	C	$HClO_4$-Extrakte von in flüssiger Luft fixierten, mechanisch lysierten Plättchen
Mills, D. C. B. et al. (86)	7,0	4,0	0,5	1,8	B	$HClO_4$-Extrakte von PRP bei 0 °C
Mills, D. C. B. et al. (86)	5,6	3,5	0	1,6	D	Äthanolextrakte lysierter (1 % Triton) Plättchen; Abzentrifugation der Proteine
Weiss, H. J. et al. (141)	4,6	2,4	n.b.	1,9	D	Äthanolextrakte aus PRP
Summerfield, G. P. et al. (126)	5,3	2,8	n.b.	1,9	D	Äthanolextrakte aus PRP
Meyers, H. et al. (79)	5,5	3,0	n.b.	1,8	D	Äthanol-EDTA-Extrakte gelfiltrierter Plättchen
Holmsen, H. et al. (51)	7,3	3,7	n.b.	2,0	D	Äthanol-EDTA-Extrakte gewaschener Plättchen (EDTA: 1 mM)
Holmsen, H. et. al. (51)	9,1	4,1	n.b.	1,9	D	Äthanol-EDTA-Extrakte gewaschener Plättchen (EDTA: 10 mM)
Holmsen, H, et al. (48)	4,6	2,4	n.b.	1,9	D	Äthanol-EDTA-Extrakte aus PRP und $HClO_4$-Extrakte des Proteinniederschlags
Eigene Ergebnisse	28,6	17,9	0	1,6	D	PRP-Lysate, hergestellt durch Inkubation des PRP in Tris-EDTA-Puffer bei 98 °C

A: Hexokinase-Methode
B: GAPDH/Phosphoglyceratkinase-Methode
C: Ionenaustauschchromatographie
D: Firefly-Luciferase-Methode
n.b.: nicht bestimmt

Es könnten beispielsweise durch das Waschen der Plättchen (51) oder deren Gelfiltration (79) größere Nukleotidmengen liberalisiert und bei der anschließenden Analyse nur deren metabolischer Pool erfaßt worden sein. Im Mittel kamen die zitierten Autoren (Tab. VII) auf intrathrombozytäre ATP- und ADP-Konzentrationen von 6 bzw. 4 µmol/10^{11} Blutplättchen. Sollten die Konzentrationsangaben nur die für den Stoffwechsel benötigten Thrombozytennukleotide repräsentieren, so entspräche der daraus berechenbare Gesamtnukleotidgehalt sehr gut den selbst gemessenen Werten.

Trifft die Kompartimentierung der Nukleotide auch für die Blutplättchen der anderen Mammalia zu, so könnten diese Überlegungen ebenfalls die hier vorliegenden Differenzen zu den Resultaten anderer Arbeitsgruppen (Tab. VIII) erklären.

AMP mußte vor seinem Nachweis enzymatisch zu ATP umgewandelt werden. Weder im PRP noch im PPP der zehn untersuchten Spezies konnten jedoch auf diese Weise Spuren von AMP nachgewiesen werden. Die Ursache für diesen, von den Ergebnissen einiger anderer Autoren (42, 86, 119) abweichenden Befund kann nicht auf einer Insuffizienz der phosphorylierenden Reagenzien beruhen. In den durchgeführten Tests zur Aufstellung der Eichkurve (Abb. 4) waren mit denselben Reaktionsgemischen bekannte, aus Standardproben entnommene AMP-Mengen phosphoryliert und anschließend mit der Biolumineszenz erfolgreich quantifiziert worden.

Allgemein müssen also die intrathrombozytären AMP-Konzentrationen sehr niedrig liegen; Hinweise dafür finden sich in den o. a. Berichten. Die in der vorliegenden Studie verwendeten Aufbereitungs- und Nachweismethoden waren vielleicht zur Bestimmung so geringer Nukleotidkonzentrationen nicht mehr geeignet. Auch den beiden anderen, in Tab. VIII erwähnten, mit der Firefly-Luciferase-Technik arbeitenden Forschungsgruppen (79, 86) mißlang ein positiver AMP-Nachweis in den Blutplättchen von sechs verschiedenen Mammalia, die des Menschen ausgeschlossen.

Eine Aggregation der Blutplättchen – in vivo ein Prozeß, der die erste Phase der Blutgerinnung terminiert – kann in vitro nicht nur, wie schon erwähnt, durch exogenes ADP, sondern auch durch Zugabe einer ganzen Reihe anderer Substanzen ausgelöst werden, wobei für einen vollständigen Ablauf die gleichzeitige Anwesenheit von Fibrinogen und divalenter Kationen, allem voran Ca^{++},

Tab. VIII: Zusammenfassung der Ergebnisse bisher veröffentlichter Adeninnukleotid-Bestimmungen an den Blutplättchen verschiedener Säugetiere (Konzentrationsangaben in µmol/10^{11} PLättchen; Mittelwerte)

AUTOR	Katze			Hund			Pferd			Schwein			Kaninchen			Meerschweinchen		
	ATP	ADP	Quot.	ATP	ADP	Quot.	ATP	ADP	Quot.	ATP	ADP	Quot.	ATP	ADP	Quot.	ATP	ADP	Quot.
(a) Meyers, K. M. et al. (79)	5,4	1,5	3,6	4,3	1,2	3,6	2,4	1,2	2,0	7,6	2,4	3,2	7,1	1,1	6,5			
(b) Mills, D. C. B. et al. (86)													8,9	1,3	6,7	7,2	2,7	2,7
(c) Mills, D. C. B. et al. (86)										6,8	3,3	2,0	6,3	1,1	5,9	5,6	1,9	3,0
(d) Eigene Ergebnisse	50,4	21,4	2,4	33,0	7,4	4,5	29,9	11,7	2,6	47,7	20,2	2,4	26,0	14,3	1,8	31,7	25,6	1,2

Quot.: ATP/ADP-Quotient

(b): $HClO_4$-Extrakte von PRP bei 0 °C/GAPDH/Phosphoglyceratkinase-Methode
(a): Äthanolextrakte gelfiltrierter Plättchen
(c): Äthanolextrakte lysierter (1% Triton) Plättchen; Abzentrifugation der Proteine
(d): PRP-Lysate, hergestellt durch Inkubation des PRP in Tris-EDTA-Puffer bei 98 °C

} Firefly-Luciferase-Methode

notwendig ist (85). Die meisten, heute vertretenen Hypothesen zum Mechanismus dieses Vorgangs gehen dahin, daß die thrombozytäre Reaktion auf den Stimulus durch eine Anlagerung der Aggregationsinduktoren an Plättchenmembranrezeptoren in Gang gesetzt wird (4, 85). Speziell im Zusammenhang mit ADP vermutet man (85, 114), daß durch Koppelung an einen Rezeptor die Adenylatcyclase blockiert, die Bildung von cyclo-AMP, einer endogenen aggregationsinhibierenden Substanz, erschwert und dadurch die Plättchenaneinanderlagerung begünstigt wird. Die Wirkung von ADP soll bei Humanthrombozyten durch ATP kompetitiv hemmbar sein, das demnach gleiche Membranrezeptoren besetzen könnte (114).

In einer breit angelegten Studie fand Tosch (131) mit Hilfe der von Born (7, 8) bzw. O'Brien (101, 102) beschriebenen sog. nephelometrischen Methode, daß zwischen den Blutplättchen verschiedener Säugetiere z. T. erhebliche funktionelle Differenzen bestehen. Die Ergebnisse der Versuche von Tosch können wegen des gleichen Untersuchungsmaterials und einer identischen Vorbereitung der Plasmaproben sehr gut den Resultaten der vorliegenden Arbeit gegenüber gestellt werden. Es soll im folgenden daher kurz auf das Prinzip der nephelometrischen Technik eingegangen werden. Als Meßvorlage dient PRP, das sich in einer Küvette im Strahlengang eines Photometers (Aggregometers) befindet und dort kontinuierlich umgerührt wird. Unter ständiger Registrierung der Lichttransmission können dem PRP jetzt verschiedene, die Plättchenfunktion beeinflussende Substanzen zugesetzt werden. Eventuelle Thrombozytengrößen und -formveränderungen bzw. das sich Aneinanderlagern von Blutplättchen zu Aggregaten ist auf diese Weise verfolgbar. Dabei ist das Aggregometer so geeicht, daß unbehandeltes PRP eine Lichttransmission von 0,1 und autologes PPP von 1,0 liefert. Versetzt man die PRP-Probe mit einem Aggregationsinduktor, so nimmt die Lichttransmission in dem Maße zu, in dem sich Thrombozytenaggregate bilden; bei ausreichender Konzentration aller für den Vorgang benötigter Faktoren hängt das maximale Aggregationsausmaß (= maximale Lichttransmission; T_{max}) ganz wesentlich von der Reaktionslage der Plättchen im PRP ab. Tab. IX gibt eine vergleichende Gegenüberstellung der von Tosch beschriebenen Befunde und der Resultate der eigenen Adeninnukleotidbestimmungen.

Neben den Blutplättchen vom Menschen wurden in beiden Studien diejenigen von weiteren sieben Säugetieren untersucht. Tabellarisch sind hier die innerhalb 5 min nach ADP- (17 µmol/l)

Tab. IX: T_{max} (in %; Maß der Plättchenreaktivität), ATP/ADP-Quotienten und ADP-Konzentrationen im PRP bei acht verschiedenen Spezies

SPEZIES	T_{max} in % (ADP: 17 µmol/l) [nach Tosch (131)]	ATP/ADP Quotient [Eigene Resultate]	ADP-Gehalt ($mg/10^{11}$ Plättchen) [Eigene Resultate]
Mensch	95	2,0	7,8
Schwein	87	2,7	8,8
Kaninchen	93	3,0	6,2
Katze	83	2,6	9,3
Hund	62	7,1	3,2
Meerschweinchen	80	1,4	11,1
Rind	88	1,8	6,0
Schaf	70	1,9	5,7

Zugabe zum Ca^{++}-angereicherten PRP registrierbaren durchschnittlichen T_{max}-Werte, der mittlere ADP-Gehalt pro 10^{11} Plättchen und das Verhältnis von thrombozytärem ATP zu ADP aufgeführt.

Zwischen den angegebenen T_{max}-Werten und den jeweils dazugehörigen ATP/ADP-Quotienten fand sich eine negative Korrelation; bei der Regressionsanalyse errechnete sich ein Koeffizient $r = -0{,}61$, die Beziehung war statistisch hochsignifikant ($p < 0{,}001$). Dies bedeutet, daß die Aggregabilität der Blutplättchen um so mehr abnimmt, je mehr intrathrombozytäres ATP das dort vorhandene ADP überwiegt, – ein Befund, der mit der erwähnten Hypothese (114) im Einklang steht, nach der ATP den aggregationsinduzierenden Effekt von ADP kompetitiv zu hemmen vermag. Die T_{max}-Werte korrelierten dagegen direkt mit der im entsprechenden PRP gefundenen, der intrathrombozytären gleichzusetzenden ADP-Konzentration. Mit einem Regressionskoeffizienten $r = 0{,}45$ ergab sich zwischen beiden eine statistisch signifikante Beziehung ($p < 0{,}01$); m. a. W. das Ausmaß der durch ADP induzierten Aggregation der Blutplättchen hängt von deren intrathrombozytärem ADP-Gehalt direkt ab. Unter der Voraussetzung, daß die ADP induzierte Thrombozytenaggregation auch in vivo bedeutsam ist, könnte dieser Befund die größere Blutungsneigung bei Patienten erklären, deren Blutplättchen eine „storage pool deficiency" aufweisen, die also weniger an Adeninnukleotiden enthalten (48).

Zwischen dem Ausmaß der Aggregationen, die von Tosch mit PRP der verschiedenen Spezies unter Verwendung anderer Stimulantien (z. B. Adrenalin, Kollagen, Serotonin etc.) registriert wurden und den entsprechenden thrombozytären Adeninnukleotidkonzentrationen konnten keine Beziehungen hergestellt werden. In

diesen Fällen scheint demnach die Plättchenaggregabilität von Faktoren bestimmt zu werden, die nicht mit dem thrombozytären Nukleotid-Gehalt in Verbindung stehen.

4. Thrombozytenspezifische Proteine: PF_4 und β-Tg

Diese beiden Eiweiße, deren Existenz bereits 1955 von Deutsch (22) vermutet wurde – 1975 beschrieben und charakterisierten Moore und Mitarbeiter (89) erstmals β-Tg, 1976 Levine und Wohl (71) PF_4 – gelten mit Recht als thrombozytenspezifisch, da sie unter physiologischen Bedingungen ausschließlich in den Blutplättchen lokalisiert sind (74, 97). Aufgrund seines Kollagenase-Hemm- und Elastase-Potenzier-Effekts wurde dem PF_4 eine potentielle Rolle bei Wundheilungsprozessen zugeschrieben (47, 73). Für beide Proteine stellte sich als typische Eigenschaft heraus, daß sie die Wirkung von Heparin aufzuheben vermögen. Ansonsten ist, ebenso wie im Falle der β-Glucuronidase, die physiologische Bedeutung der plättchenspezifischen Proteine bisher noch weitgehend unbekannt. Die erwähnte „Anti-Heparin-Aktivität" gab Anlaß zu der Vermutung, daß hier ein wichtiger Mechanismus bei spontan auftretenden, intravasalen Gerinnungsprozessen vorliege; außerdem war dies auch jahrelang die Basis der einzigen Möglichkeit des quantitativen Plättchen-Protein-Nachweises. Mit der Einführung der chromogenen Substrate in die Laboratoriumsanalytik schien die Messung des plasmatischen Heparineffekts und damit der Antiheparinaktivität des Thrombozyteninhalts um ein Vielfaches an Genauigkeit gewonnen zu haben (136). In den eigenen Vorversuchsserien stellten sich jedoch die indirekten, auf der Heparin-Hemmung beruhenden Bestimmungstechniken – zumindest zur Klärung der anstehenden Fragen – als ungeeignet heraus.

Ende der siebziger Jahre gelang es verschiedenen Arbeitsgruppen, die intrathrombozytäre Anti-Heparin-Gesamtaktivität in fünf einzelne Plättchenproteine aufzuschlüsseln (96): Plättchenfaktor 4 (PF_4), β-Thromboglobulin (β-Tg), Low affinity-PF_4 (LA-PF_4), Platelet basic protein (PBP) und Thrombospondin.

In der vorliegenden Studie wurden sog. kompetitive Radioimmunoassays (RIA) zur Quantifizierung von PF_4 und β-Tg verwendet, die ausschließlich für den Nachweis der Humanproteine entwikkelt worden waren. Dabei zeigte sich, daß bei neun verschiedenen Säugetieren nur die Thrombozyten von Mensch, Katze und Kaninchen meßbare PF_4-Konzentrationen und nur Humanplätt-

chen β-Tg enthielten.

Hinsichtlich des PF_4-Gehalts von menschlichen Thrombozyten stehen die eigenen Resultate in guter Übereinstimmung mit den Daten anderer Autoren. So haben Niewiarowski et al. (95) mit Hilfe der radialen Immunodiffusionstechnik eine Human-PF_4-Konzentration von 42,7 ± 11 µg/10^9 Plättchen, Rucinski und Mitarbeiter (116) radioimmunologisch 24,4 ± 4,3 µg/10^9 Plättchen und Weiss et al. (141) ebenfalls mit einem RIA 18 ± 7,4 µg/10^9 Thrombozyten gemessen. Lediglich Files et al. (31) geben Konzentrationswerte an (1,36 ± 0,24 µg/10^9 Plättchen), die um das 40-fache niedriger liegen, als die eigenen Resultate.

Kaninchen- und Katzenthrombozyten haben nach den eigenen Untersuchungen einen PF_4, der demjenigen des Menschen immunologisch zu gleichen scheint und in Katzenplättchen quantitativ in ähnlicher Größenordnung wie beim Menschen vorliegt. Über die Existenz eines solchen PF_4 in den Thrombozyten verschiedener Säugetiere bestehen in der Literatur erhebliche Meinungsverschiedenheiten. Einige Arbeitsgruppen konnten das Plättchenprotein bei Rhesusaffe (Macaca mulatta) (29, 93), Rind (16, 150), Schwein (115), Kaninchen (37, 77) und Katze (133) nachweisen und, zumindest in Rhesusaffen- und Katzenthrombozyten, radioimmunologisch mit Antihumanproteinserum quantifizieren. Anderen Autoren (115) hingegen mißlang der PF_4-Nachweis bei Rind, Hund und Katze. Nach Untersuchungen von Ginsberg und Mitarbeitern (37) soll der PF_4 des Kaninchens demjenigen des Menschen homolog sein, was sowohl seine Molekülgröße und Aktivität, als auch seine Aminosäuresequenz und immunologische Kreuzreaktivität anbelangt. In allen Publikationen, die über das Vorhandensein von PF_4 in den Plättchen der untersuchten Tierarten berichten, fehlen jedoch Konzentrationsangaben, die mit den eigenen Daten vergleichbar wären.

Die bei Hund, Schaf, Schwein, Ziege, Pferd und Meerschweinchen sehr niedrigen PF_4-Resultate der vorliegenden Untersuchungen mögen darauf beruhen, daß entweder tatsächlich in den Plättchen der genannten Spezies ein entsprechendes Protein fehlt, oder – was wahrscheinlicher ist – daß das PF_4 bei diesen Tieren immunologisch von demjenigen des Menschen, der Katze und des Kaninchens abweicht, ein gegen Humanthrombozytenproteine gerichtetes Antiserum solche Substanzen nicht zu erfassen

imstande ist. Eine eindeutige Klärung könnten hier nur die gezielte Isolierung der Thrombozyteneiweiße und deren Aminosäuresequenzanalysen bei den verschiedenen Säugetieren liefern.

Vergleicht man die bisher nur in Humanthrombozyten gefundenen und für diese beschriebenen β-Tg-Werte aus der verfügbaren Literatur (31, 88, 141) mit denjenigen der vorliegenden Studie, so scheinen auf den ersten Blick größere Diskrepanzen zu bestehen; die eigenen Daten liegen bis zu 30-fach höher als die Werte der zitierten Arbeiten. Einerseits könnten solche Abweichungen durch unterschiedliche Techniken bei der Präparation der Meßvorlagen erklärt werden. Andererseits wäre aber auch durchaus denkbar, daß die anderen Thrombozytenproteine, wie LA-PF_4 oder PBP den β-Tg-RIA beeinflussen, da sie ähnliche antigene Determinanten besitzen. Nach Niewiarowski et al. (99) soll LA-PF_4 etwa 80 %, PBP etwa 12 % und β-Tg nur etwa 8 % der Gesamtkonzentration dieses freisetzbaren, immunologisch nahezu einheitlichen Proteinkomplexes ausmachen. Unter diesem Aspekt würden die eigenen Werte einem β-Tg-Gehalt zwischen 10 und 15 µg/10^9 Thrombozyten entsprechen – Größenordnungen, die dann mit denjenigen der zitierten Autoren im Einklang stehen.

Aufgrund der Plättchenspezifität von PF_4 und β-Tg wird die Bestimmung dieser Proteine im Plasma – heute teilweise schon routinemäßig – als indirekte Methode zur Beurteilung einer gesteigerten Thrombozytenreaktivität in vivo herangezogen. Nach der Arbeitsanleitung des in der vorliegenden Studie verwendeten PF_4-RIA liegt der PF_4-Spiegel-Normbereich im Humanplasma – nach „schonender Herstellung" der Meßproben – bei 0 bis 10,4 ng/ml. Die eigenen, für Humanthrombozyten ermittelten PF_4-Gesamtkonzentrationen zeigen interindividuelle Streuungen von 27 %. Deshalb wäre es sicher ratsam, nicht allein die Plasmakonzentration zur Diagnostik heranzuziehen, sondern diesen Wert in Relation zum intrathrombozytären PF_4-Gesamtgehalt der jeweils untersuchten Person zu stellen. Es sollten also neben Plasmamessungen auch Bestimmungen in vorbehandeltem PRP durchgeführt werden, um präzisere und aussagekräftigere Werte an der Hand zu haben.

5. Vergleich von Inhalt und Morphologie der Thrombozyten verschiedener Säugetiere

Transmissionselektronenoptisch vergrößerte Fotografien von Ultradünnschnitten fixierter ungereizter Human-Plättchen (Abb. 13) lassen die Vielfalt thrombozytärer Substrukturen deutlich werden. Man kann, nach dem derzeitigen Stand der Kenntnisse, dabei ein System von teilweise gefüllten Vesikeln oder Granula, zu dem hier die Mitochondrien (vom Crista-Typ) gezählt werden sollen, von einem System kanalikulärer bzw. tubulärer Hohlräume unterscheiden. Zu dem letzteren zählt das „Open canalicular system" (OCS), das als eine nach innen gestülpte, mit der Thrombozytenoberfläche in Kontakt stehende Membranreserve anzusehen ist. Es wird angenommen, daß die bei der Freisetzungsreaktion aus den Thrombozyten exozytierten Substanzen über das OCS ausgeschleust werden (57, 143). Ein zweiter Röhrenverband, das „Dichte tubuläre System" (DTS), entstammt offenbar dem granulierten endoplasmatischen Retikulum der thrombozytären Mutterzelle, dem Megakaryozyten. Eine der Hauptfunktionen des DTS soll in der Unterstützung der marginalen Mikrotubuli liegen, die der Formerhaltung ungereizter Blutplättchen dienen (144). OCS und DTS kommunizieren nicht miteinander.

Während die Mitochondrien als Lokalisation der oxydativen Phosphorylierung und damit der Energiebereitstellung anzusehen sind, gelten die Granula als mehr oder weniger spezifische Speicherstrukturen verschiedener, bei adäquater Reizung in unterschiedlichem Ausmaß freisetzbarer Substanzen. Dabei herrscht in der Literatur weitgehende Übereinstimmung bezüglich des Speicherorts der Adeninnukleotide: 60% davon sind, wie oben erwähnt, als „nicht-metabolischer Pool" in den sog. Dense Bodies (DB) lokalisiert, der Rest verteilt sich auf Zytoplasma, Mitochondrien und kontraktile Elemente (48, 49, 55, 79). Die DB lassen sich recht gut durch ihre deutlich größere elektronenoptische Dichte und den oft exzentrisch zusammengeschrumpften Inhalt („Bullaugengranula") von den übrigen Granula unterscheiden (Abb. 13).

Auseinandergehende Ansichten werden dagegen über den Ort der thrombozytären Speicherung der β-Glucuronidase geäußert. Nach Untersuchungen mit subzellulärer Fraktionierung von Thrombozyten und Auslösung der Freisetzungsreaktion sollen sich die sauren Hydrolasen in α-Granula (Organellen mit geringerer optischer Dichte, als sie die DB besitzen; Abb. 13) befinden (21, 49, 50, 75) – einer Auffassung, der sich auch Holmsen auf-

grund von Studien mit Thrombozyten von Patienten, die an einer „storage pool disease" litten, anschloß (54). Danach sollen solche Plättchen eine gegenüber den Thrombozyten von gesunden Probanden deutlich geringere Anzahl von DB, dabei jedoch normal hohe Aktivitäten an sauren Hydrolasen aufweisen. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse zytochemischer Untersuchungen von Bentfeld-Barker und Bainton (5), Siegel und Lüscher (122) und Kaplan (61), die die höchste β-Glucuronidase-Aktivität in einer Subfraktion der Blutplättchen nachwiesen, die aus Mikrovesikeln unterschiedlicher Größe bestand. In der Fraktion, die α-Granula enthielt, zeigte von den Hydrolasen nur die saure Phosphatase eine hohe Aktivität; die in den α-Granula gemessene β-Glucuronidase-Aktivität betrug lediglich 13 % des insgesamt in den Plättchen nachzuweisenden Enzymgehalts.

Zahlreiche Hinweise haben sich jedenfalls dafür gefunden, daß die α-Granula die plättchenspezifischen Proteine enthalten (60, 74, 117, 140). Weiss et al. (138, 141) konnten anhand von Thrombozyten, die von Patienten mit „storage pool deficiency" stammten, nachweisen, daß der thrombozytäre Adeninnukleotid-Gehalt mit der Zahl der DB, die Menge an plättchenspezifischen Proteinen aber signifikant mit der Zahl der α-Granula korrelierte. Auf einen gemeinsamen Speicherort von PF_4 bzw. β-Tg und β-Glucuronidase deuten auch die Resultate der eigenen Untersuchungen hin; in verschiedenen PPP-Proben fanden sich parallel hohe PF_4- und β-Glucuronidase-Spiegel bei niedrigen Adeninnukleotidmengen.

Fukami und Salganicoff (34) vermuten sogar das Vorhandensein von insgesamt vier, sich in ihrer elektronenoptischen Dichte unterscheidender Speicherorganellen im Humanthrombozyten: im ersten Typ sollen u. a. die Adeninnukleotide, im zweiten die plättchenspezifischen Proteine, im dritten und im vierten die verschiedenen sauren Hydrolasen abgespeichert sein.

In systematisch-vergleichenden raster- und transmissionselektronenmikroskopischen Studien sind kürzlich die Blutplättchen von insgesamt zehn Spezies (bis auf Rind und Pferd identisch mit denjenigen der vorliegenden Arbeit) morphometriert worden (36). Aus den morphometrischen Primärdaten Fläche (F), Umfang (U) und Zahl (N) der thrombozytären Substrukturen wurden durch Bezug auf die Größe bzw. den Raumanteil des jeweiligen Einzelplättchens die entsprechenden stereologischen Sekundärpara-

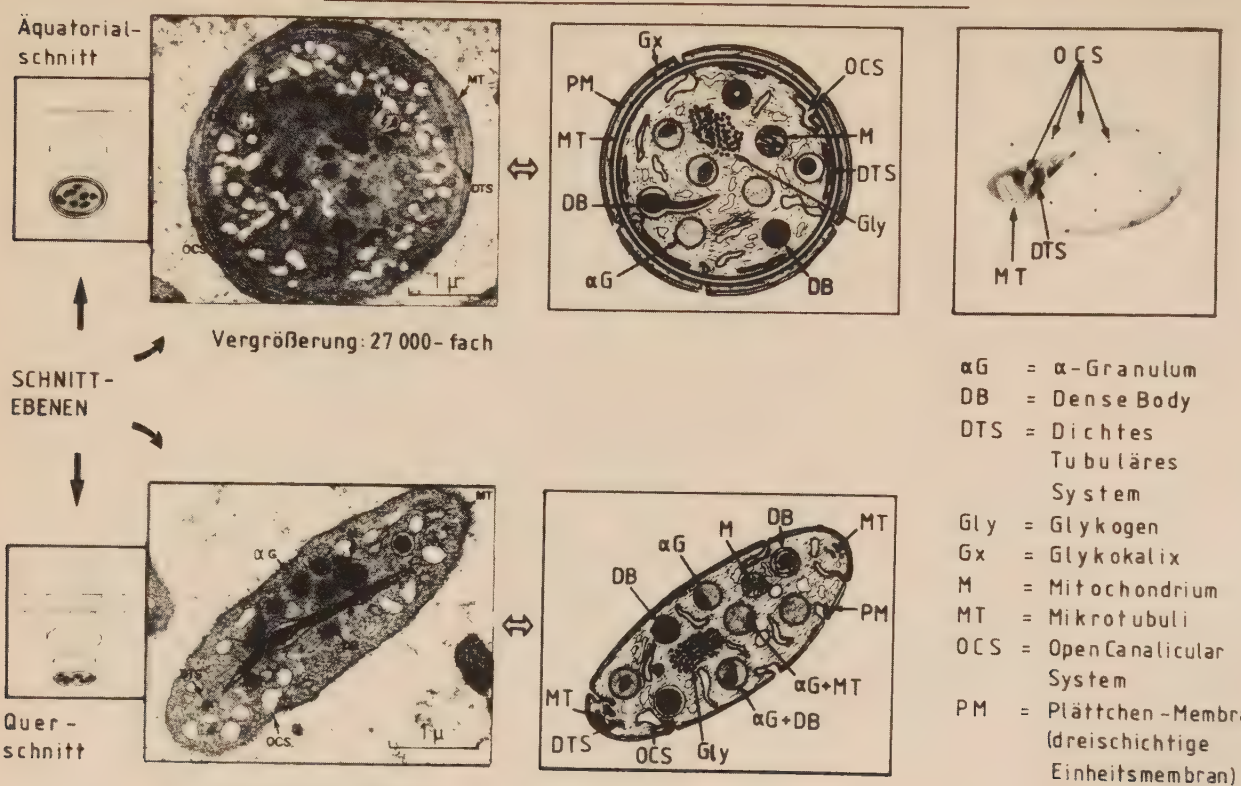
MORPHOLOGIE diskoidaler THROMBOZYTEN
Äquatorial-
schnitt
MT
DTS
OCS
1 µ
Vergrößerung: 27 000- fach
Gx
PM
MT
DB
αG
OCS
M
DTS
Gly
DB
OCS
DTS
MT
SCHNITT-
EBENEN
αG
DB
MT
OCS
1µ
Quer-
schnitt
Vergrößerung: 28 800- fach
αG
M
DB
MT
DB
PM
αG+MT
αG+DB
MT
DTS
OCS
Gly
αG = α-Granulum
DB = Dense Body
DTS = Dichtes
Tubuläres
System
Gly = Glykogen
Gx = Glykokalix
M = Mitochondrium
MT = Mikrotubuli
OCS = Open Canalicular
System
PM = Plättchen-Membran
(dreischichtige
Einheitsmembran)

Abb. 13

meter Volumendichte (Vv), Oberflächendichte (Sv) und numerische Dichte (Nv) berechnet. Es zeigte sich jedoch trotz eingehender Überprüfung, daß zwischen den in der zitierten Studie erhobenen Resultaten und den biochemischen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit rechnerisch keine signifikanten Beziehungen herzustellen waren. Dies mag darauf beruhen, daß noch andere Substanzen, die neben den hier bestimmten, in den α-Granula und in den Dense Bodies enthalten sind (96), deren morphologisches Erscheinungsbild maßgeblich prägen. Abschließend läßt sich zu diesem Aspekt jedenfalls sagen, daß mit der bisher verfügbaren Technik elektronenmikroskopisch erhebbare, morphologisch-stereologische Befunde keine direkten Rückschlüsse auf den thrombozytären Gehalt gewisser, definierter Speichersubstanzen gestatten.

Zusammenfassung

Die in den vergangenen Jahrzehnten zu beobachtende zunehmende Beteiligung herzkreislaufbedingter Erkrankungen an der Morbidität und Mortalität wird heute zu einem großen Teil dysfunktionalen Blutplättchen zugeschrieben. Deshalb ist die Forschung in steigendem Maße interessiert, Substanzen und Therapieprinzipien zu entwickeln, die die thrombozytäre Funktion zu steuern imstande sind. Die in vivo-Testung solcher Präparate in der vorklinischen Phase findet üblicherweise an Laborversuchstieren statt, deren Thrombozyten sich jedoch, wie ausführliche vergleichende in vitro-Studien demonstrieren konnten, funktionell z. T. erheblich von Humanthrombozyten unterscheiden. Zweck der vorliegenden Arbeit war es u. a., nach Ursachen für diese thrombozytärfunktionellen Differenzen bei den verschiedenen Säugetieren zu suchen. Dazu sollten mit z. T. zu modifizierenden Techniken bei zehn verschiedenen Spezies vergleichend der intrathrombozytäre Gehalt der sauren Hydrolase β-Glucuronidase, der Adeninnukleotide ATP, ADP und AMP und der thrombozytenspezifischen Proteine Plättchenfaktor 4 (PF_4) und β-Thromboglobulin (β-Tg) bestimmt werden. Die eigentlichen Meßvorlagen waren die jeweils durch Differentialzentrifugation aus Vollblut gewonnenen plättchenreichen und plättchenarmen Plasmen (PRP bzw. PPP).

Mit zwei kolorimetrischen, für Serumanalysen vorgesehenen Nachweisverfahren, konnten nach entsprechender Anpassung an die Meßvorlagen bei Katze, Kaninchen und Hund relativ hohe, bei Mensch und Meerschweinchen mittlere und bei Schwein, Rind, Pferd, Schaf und Ziege nur relativ geringe bzw. keine intrathrombozytären Enzymaktivitäten nachgewiesen werden. β-Glucuronidase wurde als einer der zur Entstehung der Arteriosklerose beitragenden Faktoren beschrieben, über seine eigentliche Rolle dabei wurden bisher jedoch diametrale Ansichten geäußert.

Die Resultate der vergleichenden Enzymanalyse deuten nun an, daß gerade die Tiere, bei denen spontan auftretende arteriosklerotische Gefäßwandveränderungen so gut wie nie zu beobachten sind (wie z. B. der Hund), relativ hohe Aktivitäten, Tiere hingegen, die zur Arteriosklerose geradezu neigen (wie z. B. das Schwein), relativ geringe thrombozytäre Enzymaktivitäten aufweisen. Die Bedeutung der β-Glucuronidase ist somit eher in einer Arteriosklerose-protektiven, als einer sie fördernden Wirkung zu sehen.

Mit der Biolumineszenz-Technik fanden sich allgemein höhere thrombozytäre Adeninnukleotidkonzentrationen, als bisher beschrieben worden sind. Die erwähnten funktionellen Differenzen, die zwischen den Thrombozyten der verschiedenen Spezies registriert werden konnten, drücken sich statistisch absicherbar auch in Differenzen hinsichtlich des thrombozytären ADP-Gehalts bzw. des ATP/ADP-Quotienten aus, und zwar in dem Sinne, daß Thrombozyten mit hoher ADP-Konzentration gegenüber exogenem ADP am heftigsten reagieren bzw. mit einem hohen Nukleotid-Quotienten (d. h. mit höherem thrombozytärem ATP-Anteil) eine geringere Aggregationsneigung auf exogenes ADP zeigen. Bei keiner der untersuchten Säugetierarten fand sich im übrigen in den Thrombozyten AMP, was mit einer zu geringen Sensitivität der Meßtechnik erklärt wird.

Unter Verwendung kompetitiver Radioimmunoassays (RIA) zeigte sich, daß lediglich Menschen-, Kaninchen- und Katzenthrombozyten PF_4 in meßbarer Quantität enthielten, von allen untersuchten Mammalia nur der Mensch in seinen Blutplättchen β-Tg aufwies. Es muß jedoch zunächst einmal angenommen werden, daß auch die übrigen Spezies thrombozytenspezifische Proteine besitzen. Wahrscheinlich mißlang deren Nachweis nur aufgrund der Spezifität des für den RIA benutzten Antiserums, das gegen die Eiweiße der Humanthrombozyten gerichtet war. Somit ist der RIA in seiner bisherigen Anwendung nur für Beobachtungen beim Menschen, der Katze und dem Kaninchen ohne Einschränkung geeignet. Aufgrund der registrierten hohen interindividuellen Streubreite von PF_4 ist neben seiner sonst alleinig üblichen Bestimmung im PPP die zusätzliche Kontrolle des intrathrombozytären Gesamtgehaltes empfehlenswert.

Der hohe Anteil an β-Glucuronidase und PF_4, der im Plasma besonders bei Kaninchen, Katze, Hund, Meerschweinchen, Pferd, Schaf und Ziege nachweisbar war, läßt auf eine bei den Thrombozyten dieser Tierarten leichter auszulösende Freisetzung der genannten Substanzen schließen. Dieser Befund bestärkt andererseits auch die Vermutung, daß beide Substanzen in ein und demselben Thrombozytenorganellentyp gespeichert sind. Zu den Resultaten vergleichender morphologisch-stereologischer Untersuchungen an den Plättchen und Plättchenorganellen der gleichen Spezies bestehen keine Beziehungen, woraus zu folgern ist, daß eine Vermessung von Zahl und Größe bestimmter Granula alleine noch keine Aussage über eventuelle Konzentrationsgrößen der dort gespeicherten Substanzen gestattet.

Literaturverzeichnis

1. Abbate Gensini, R.; Gensini, G.F.; Marinoni, N.:

   Circulating platelet aggregates and increased platelet turnover in hypertensive patients.

   In: Straw, A. (ed), Advances in coagulation, fibrinolysis, platelet aggregation and atherosclerosis. pp. 383 – 407 (C.E.P.I., Rome 1978)

2. Altman, K.L.; Springer, B.:

   Blood plasma anti-glucuronidase-activity.

   Fed. Proc. 7 : 154 – 161 (1948)

3. Benner, K.U.; Geeren, M.; Burstedde, V.; Everts, B.:

   Platelet function abnormalities in arterial occlusive diseases (AOD).

   J. Med. (im Druck)

4. Bennett, J.S.; Colman, R.F.; Colman, R.W.:

   Identification of adenine nucleotide binding proteins in human platelet membranes by affinity labelling with 5-p-fluorosulfonyl-benzoyl adenosine.

   J. Biol. Chem. 253 : 7346 – 7354 (1978)

5. Bentfeld-Barker, M.E.; Bainton, D.F.:

   Identification of primary lysosomes in human megakarocytes and platelets.

   Blood 59 : 472 – 481 (1982)

6. Betteridge, D.J.; Zahavi, J.; Jones, N.A.G.:

   Platelet function in diabetes mellitus in relationship to complications, glycosylated haemoglobin and serum lipoproteins.

   Eur. J. Clin. Invest. 11 : 273 – 277 (1981)

7. Born, G.V.R.:

Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal.

Nature 194 : 927 – 929 (1962)

8. Born, G.V.R.:

Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets.

J. Physiol. (Lond.) 162 : 67 – 68 (1962)

9. Branwood, A.W.; Carr, A.J.:

β-glucuronidase-activity of coronary atherosclerotic plaques.

Lancet II : 1254 – 1255 (1960)

10. Breddin, K.; Krzyzwanek, H.J.; Ziemen, M.:

Methoden zur Erfassung einer Thromboseneigung oder zur Erkennung arterieller Gefäßprozesse.

Therapiewoche 25 : 1558 – 1570 (1975)

11. Cade, J.F.; Doyle, D.J.; Chesterman, C.N.:

Platelet function in coronary artery disease: effects of coronary surgery and sulfinpyrazone.

Circulation 66 : 29 – 32 (1982)

12. Cajuni, F.:

Inhibition by heparin of the enzymic hydrolysis of phenolphthalein-β-glucuronid.

Atti. Soc. Lombarda Sci. Med. Biol. 12 : 286 – 293 (1957)

13. Calabrese, S.; Giansante, C.; Burigana, F.; Feruglio, F.S.:

Platelet factors 3 and 4 in juvenile diabetes and newborns of diabetic mothers.

Minerva. Med. 72 : 2255 – 2260 (1981)

14. Carvalho, A.C.A.; Colman, R.W.; Lees, R.S.:

Platelet function in hyperlipoproteinemia.

N. Engl. J. Med. 290 : 434 – 438 (1974)

15. Carvalho, A.C.A.; Colman, R.W.; Lees, R.S.:

Clofibrate reversal of platelet hypersensitivity in hyperbeta-lipoproteinemia.

Circulation 50 : 570 – 574 (1974)

16. Ciaglowski, R.E.; Snow, J.W.; Walz, D.A.:

Bovine platelet antiheparin protein: platelet factor 4.

Ann. NY. Acad. Sci. 370 : 668 – 679 (1981)

17. Clowes, A.W.; Varnovsky, M.J.:

Failure of certain anti-platelet drugs to affect myointimal thickening following arterial endothelial injury in the rat.

Lab. Invest. 36 : 452 – 464 (1977)

18. Colwell, J.A.; Winocour, P.D.; Halushka, P.V.:

Do platelets have anything to do with diabetic microvascular disease?

Diabetes 32 : suppl. 2 : 14 – 19 (1983)

19. Couch, J.R.; Hassanein, R.S.:

Platelet aggregation, stroke and transient ischemic attack in middle-aged and elderly patients.

Neurology 26 : 888 – 895 (1976)

20. Davignon, J.:

The lipid hypothesis.

Arch. Surg. 113 : 28 – 34 (1978)

21. Day, H.J.; Holmsen, H.; Hovig, T.:

Subcellular particles of human platelets. A biochemical and electronmicroscopic study with particular reference to the influence of fractination techniques.

Scand. J. Haematol. 8 (suppl.) : 7 – 35 (1969)

22. Deutsch, E.; Johnson, S.A.; Seegers, W.H.:

Differentiation of certain platelet factors related to blood coagulation.

Circ. Res. 3 : 110 – 116 (1955)

23. Dodds, W.J.:

Platelet function in animals: species specifities.

In: de Gaetano, G.; Garattini, S. (eds), Platelets: a multidisciplinary approach. pp. 45 – 59 (Raven Press, New York 1978)

24. Dohrmann, R.; Klesper, R.:

Untersuchungen zur β-Glucuronidase-Aktivität menschlicher Thrombozyten.

Klin. Wochenschr. 38 : 595 – 598 (1960)

25. Dubach, U.C.; Jösch-Locher, M.:

Serum β-Glucuronidase-Aktivität in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter bei Diabetes mellitus.

Clin. Chim. Acta 21 : 453 – 460 (1968)

26. Dyrbye, M.; Kirk, J.E.:

The β-glucuronidase activity of aortic and pulmonary artery tissue in individuals of various ages.

J. Gerontol. 11 : 33 – 37 (1956)

27. Ek, J.; Thunell, S.; Blomback, M.:

Enhanced in-vivo platelet activation in diabetes mellitus.

Scand. J. Haematol. 29 : 185 – 191 (1982)

28. Everts, B.; Benner, K.U.; Böhme, H.:

Possible role of platelets in the development of acute arterial occlusive diseases (AOD).

Proc. Europ. Symp. Haemorheol. Dis. Nancy 1979

29. Fabrizi, P.; Barbarulli, G.; Castellani, M.; Tarli, P.:

Identity between human and monkey platelet factor 4 antigen(s) in a RIA system.

Thromb. Res. 21 : 165 – 168 (1981)

30. Farbiszewski, R.; Niewiarowski, S.:

Einfluß von verschiedenen Arzneimitteln auf die Thrombozytenaggregation und die Freisetzung des Blutplättchenfaktors 4 (Antiheparinfaktor).

Folia Haematol. (Leipz.) 92 : 470 – 476 (1969)

31. Files, J.C.; Malpass, T.W.; Yee, E.K.:

Studies of human platelet alpha-granule release in-vivo.

Blood 58 : 607 – 618 (1981)

32. Fishman, W.H.; Kato, K.; Austiss, C.L.; Green, S.:

Human serum β-glucuronidase; its measurement and some of its properties.

Clin. Chim. Acta 15 : 435 – 447 (1967)

33. French, J.E.; Jennings, M.A.; Florey, H.W.:

Morphological studies on atherosclerosis in swine.

Ann. NY. Acad. Sci. 127 : 780 – 799 (1965)

34. Fukami, M.H.; Salganicoff, L.:

Human platelet storage organelles – A review.

Thromb. Haemost. 38 : 963 – 970 (1977)

35. Fuster, V.; Bowie, E.J.W.; Lewis, J.C.; Fass, D.N.; Owen, C.A.Jr.; Brown, A.L.:

Resistance to arteriosclerosis in pigs with von Willebrand's disease.

J. Clin. Invest. 61 : 722 – 730 (1978)

36. Geeren, M.:

Vergleichende Untersuchungen zur Morphologie und Stereologie verschiedener Säugetierthrombozyten.

Diss. LM-Univ. München (1984)

37. Ginsberg, M.H.; Hoskins, R.; Sigrist, P.; Painter, R.:

Purification of heparin neutralizing protein from rabbit platelets and its homology with human platelet factor 4.

J. Biol. Chem. 254 : 12365 – 12371 (1979)

38. Glynn, M.F.; Mustard, J.F.; Buchanan, M.R.; Murphy, E.A.:

Cigarette smoking and platelet aggregation.

Can. Med. Assoc. J. 95 : 549 – 553 (1966)

39. Gormsen, J.; Nielsen, J.D.; Dalsgaard, J.; Anderson, J.A.:

ADP-induced platelet aggregation in-vitro in patients with ischemic heart disease and peripheral thromboatherosclerosis.

Acta Med. Scand. 201 : 509 – 513 (1977)

40. Gottlieb, H.; Lalich, J.:

The occurence of atherosclerosis in the aorta of swine.

Am. J. Pathol. 30 : 851 – 855 (1954)

41. Grette, K.:

Studies on the mechanism of the thrombin-catalyzed hemostatic reactions in blood platelets.

Acta Physiol. Scand. 56 : suppl. 195 : 9 – 93 (1962)

42. Gross, R.; Schneider, W.:

Neuere Untersuchungen über den Stoffwechsel der Thrombozyten.

In: Deutsch, E.; Gerlach, E.; Moser, K. (eds), Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrozyten und Thrombozyten. pp. 206–213. 1. Internationales Symposium Wien, (Georg Thieme, Stuttgart 1968)

43. Han, P.; Ardlie, N.G.:

The influence of pH, temperature and calcium on platelet aggregation: maintenance of environmental pH and platelet function for in-vitro studies in plasma stored at 37°C.

Br. J. Haematol. 26 : 373–389 (1974)

44. Handin, R.I.; Mc Donough, M.; Lesch, M.:

Elevation of platelet factor 4 in acute myocardial infarction: measurement by radioimmunoassay.

J. Lab. Clin. Med. 91 : 340–349 (1978)

45. Haust, M.D.; Moore, R.H.:

Spontaneous lesions of the aorta in the rabbit.

In: Roberts, J.C.Jr.; Straus, R. (eds), Comparative Atherosclerosis. pp. 255–278 (Hoeber Medical Division, 1965)

46. Hawkins, R.I.:

Smoking, platelets and thrombosis.

Nature 236 : 450–452 (1972)

47. Hiti-Harper, J.; Wohl, H.; Harper, E.:

Platelet factor 4: an inhibitor of collagenase.

Science 199 : 991–992 (1978)

48. Holmsen, H.:

Compartmentation of adenine nucleotides in platelets.

In: Gerlach, E.; Moser, K.; Deutsch, E.; Wilmanns, W. (eds), Erythrocytes, Thrombocytes, Leucozytes: Recent Advances in Membrane and Metabolic Research. pp. 321 – 327 (Georg Thieme, Stuttgart 1973)

49. Holmsen, H.:

Biochemistry of the platelet release reaction.

Ciba Found. Symp. 35 : 175 – 205 (1975)

50. Holmsen, H.; Day, H.J.; Pimental, M.A.:

Adenine nucleiotide metabolism of blood platelets. V. Subcellular localization of some related enzymes.

Biochim. Biophys. Acta 186 : 244 – 253 (1969)

51. Holmsen, H.; Day, H.J.; Storm, E.:

Adenine nucleotide metabolism of blood platelets. VI. Subcellular localization of nucleotide pools with different functions in the platelet release reaction.

Biochim. Biophys. Acta 186 : 254 – 266 (1969)

52. Holmsen, H.; Day, H.J.; Stormorken, H.:

The platelet release reaction.

Scand. J. Haematol.: suppl. 8 : 1 – 26 (1969)

53. Holmsen, H.; Holmsen, I.; Bernhardsen, A.:

Microdetermination of adenosine diphosphate and adenosine triphosphate in plasma with the firefly luciferase system.

Anal. Biochem. 17 : 456 – 473 (1966)

54. Holmsen, H.; Setkowsky, C.A.; Lages, B.; Day, H.J.; Weiss, H.J.; Scrutton, M.C.:

Content and thrombin-induced release of acid hydrolysis in gel-filtered platelets from patients with storage pool disease.

Blood 46 : 131 – 142 (1973)

55. Holmsen, H.; Weiss, H.J.:

Secretable storage pools in platelets.

Annu. Rev. Med. 30 : 119 – 133 (1979)

56. Hornstra, G.; Chait, A.; Karvonen, M.J.; Lewis, B.; Turpeinen, O.; Vergroesen, A.J.:

Influence of dietary fat on platelet function in men.

Lancet I : 1155 – 1157 (1973)

57. Hovig, T.:

The ultrastructural basis of platelet function.

In: Baldini, M.G.; Ebbe, S. (eds), Platelets: Production, function, transfusion and storage. pp. 235 – 252 (Grune and Stratton, New York 1974)

58. Jakubowski, J.A.; Ardlie, N.G.:

Modification of human platelet function by a diet enriched in saturated or polyunsaturated fat.

Atherosclerosis 31 : 335 – 344 (1978)

59. Janka, H.U.; Standl, E.; Schramm, W.; Mehnert, H.:

Platelet enzyme activities in diabetes mellitus in relation to endothelial damage.

Diabetes 32 : suppl. 2 : 47 – 51 (1983)

60. Kaplan, K.L.; Broekman, M.J.; Chernoff, A.; Lesznik, G.R.; Drilling, M.:

Platelet alpha-granule proteins. Studies on release and subcellular localization.

Blood 53 : 604 – 618 (1979)

61. Kaplan, D.R.; Chao, F.C.; Stiles, C.D.; Antoniades, H.N.; Scher, C.D.:

Platelet alpha-granules contain a growth factor for fibroblasts.

Blood 53 : 1043 – 1052 (1979)

62. Kaplan, K.L.; Owen, J.:

Plasma levels of β-thromboglobulin and platelet factor 4 as indices of platelet activation in-vivo.

Blood 57 : 199 – 202 (1981)

63. Kayahan, S.:

Atherosclerosis and β-glucuronidase.

Lancet II : 667 – 669 (1960)

64. Kirk, J.E.:

β-Glucuronidase

In: Kirk, J.E. (ed), Enzymes of the arterial wall. pp. 297 – 306 (Academic Press, New York and London 1969)

65. Klesper, R.; Dohrmann, R.E.:

Der Einfluß der β-Glucuronidase auf die Blutgerinnungshemmung in-vitro.

Acta Haematol. (Basel) 25 : 228 – 235 (1961)

66. Krzyzwanek, H.J.; Breddin, K.:

Platelet aggregation as a risk factor in diabetic subjects.

In: Pfeiffer, E.F.; Rall, J.E. (eds), Pathogenic concepts of diabetic microangiopathy. pp. 11 – 14 (International Workshop, Garmisch-Grainau, Georg Thieme, Stuttgart 1981)

67. Kurihara, Y.; Nakayama, H.; Oda, K.; Nakagawa, S.:

Plasma β-thromboglobulin and plasma platelet factor 4 in diabetes mellitus.

J. Jpn. Diabet. Soc. 23 : 661 – 668 (1980)

68. Kuzuya, F.; Oguri, T.:

Activation of β-glucuronidase by β-lipoprotein and inhibition of this effect by sulphated polysaccharide.

J. Atheroscler. Res. 9 : 215 – 219 (1969)

69. Lees, R.S.; Carvalho, A.C.A.:

Hypercholesterolemia and platelets.

In: Chandler, A.B.; Eurenius, K.; Mc Millan, G.C.; Nelson, C.B.; Schwartz, C.J.; Wessler, S. (eds), The thrombotic process in atherogenesis. pp. 301 – 308 (Plenum Press, New York 1978)

70. Levine, S.P.; Lindenfels, J.; Ellis, J.B.:

Increased plasma concentrations of platelet factor 4 in coronary artery disease. A measure of in-vivo platelet activation and secretion.

Circulation 64 : 626 – 632 (1981)

71. Levine, S.P.; Wohl, H.:

Human platelet factor 4 (PF_4)-purification and characterization by affinity chromatography.

J. Biol. Chem. 251 : 324 – 328 (1976)

72. Levvy, G.A.; Marsh, C.A.:

Preparation and properties of β-glucuronidase.

Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 14 : 381 – 404 (1959)

73. Lonky, S.A.; Marsh, J.; Wohl, H.:

Stimulation of human granulocyte elastase by platelet factor 4 and heparin.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 85 : 1113 – 1118 (1978)

74. Ludlam, C.A.:

Evidence for the platelet specificity of β-thromboglobulin and studies on its plasma concentration in healthy individuals.

Br. J. Haematol. 41 : 271 – 278 (1979)

75. Marcus, A.J.; Zucker-Franklin, D.; Safier, L.B.; Ullman, H.L.:

Studies on human platelet granules and membranes.

J. Clin. Invest. 45 : 14 – 28 (1966)

76. Mc Kenzie, F.N.; Svensjö, E.; Arfors, K.E.:

Effect of sodium pentobarbital anästhesia on platelet behaviour in-vitro and in-vivo.

Microvasc. Res. 4 : 42 – 50 (1972)

77. Mc Manus, L.M.; Levine, L.M.; Pinckard, R.N.:

Platelet activating factor (PAF) induced release of platelet factor 4 (PF_4) in-vitro and during IgE anaphylaxis in the rabbit.

J. Immunol. 123 : 2835 – 2842 (1979)

78. Mehta, J.; Mehta, P.:

Platelet function in hypertension and effect of therapy.

Am. J. Cardiol. 47 : 331 – 334 (1981)

79. Meyers, K.M.; Holmsen, H.; Seachord, C.L.:

Comparative study of platelet dense granule constituents.

Am. J. Physiol. 243 : 454 – 461 (1982)

80. Miller, B.F.:

Mucopolysaccharides and atherosclerosis.

Ann. Intern. Med. 61 : 982 – 986 (1964)

81. Miller, B.F.; Aiba, T.; Keyes, F.P.; Curreri, P.W.; Branwood, A.W.:

β-glucuronidase activity and its variation with pH in human atherosclerotic arteries.

J. Atheroscler. Res. 6 : 352 – 358 (1966)

82. Miller, B.F.; Keyes, F.P.; Curreri, P.W.:

Serum β-glucuronidase activity of various species: possible correlation with susceptibility to atherosclerosis.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119 : 1129 – 1133 (1965)

83. Miller, B.F.; Keyes, F.P.; Curreri, P.W.:

Increase of serum β-glucuronidase activity in human diabetes mellitus.

J. Amer. Med. Ass. 195 : 189 – 192 (1966)

84. Miller, B.F.; Keyes, F.P.; Curreri, P.W.:

β-glucuronidase activity in serum increased by coronary artery atherosclerosis.

Science 152 : 775 – 776 (1966)

85. Mills, D.C.B.:

The basic biochemistry of the platelet.

In: Bloom, A.C.; Thomas, D.P. (eds), Haemostasis and Thrombosis. pp. 50 – 60 (Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York, 1981)

86. Mills, D.C.B.; Thomas, D.P.:

Blood platelet nucleotides in man and other species.

Nature 222 : 991 – 992 (1969)

87. Mlczoch, J.; Schernthaner, G.; Mühlhauser, I.; Silberbauer, K.:

Plättchenspezifische Proteine und Thrombozytenaggregation bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler Hypertension.

Z. Kardiol. 70 : 837 – 841 (1981)

88. Moore, S.; Pepper, D.S.:

Identification of a platelet specific release product β-thromboglobulin.

In: Gordon, I.L. (ed), Platelet Physiology. pp. 293 – 311 (Elsevier/North Holland, Biomedical Press, Amsterdam 1976)

89. Moore, S.; Pepper, D.S.; Cash, I.D.:

The isolation and characterization of a platelet specific β-globulin (β-thromboglobulin) and the detection of anti-urokinase and anti-plasmin from thrombin-aggregated washed human platelets.

Biochim. Biophys. Acta 379 : 360 – 369 (1975)

90. Mrhova, O.; Zemplenyi, T.; Lojda, Z.:

β-glucuronidase activity of the aorta in early stages of experimental rabbit atherosclerosis.

J. Atheroscler. Res. 3 : 44 – 49 (1963)

91. Mühlhauser, I; Schernthaner, G.; Silberbauer, K:

Plasma concentrations of platelet specific proteins in coronary artery disease.

Cardiology 68 : 129 – 138 (1981)

92. Murphy, E.A.; Rowsell, H.C.; Downie, H.G.; Robinson, G.A.; Mustard, J.F.:

Encrustation and atherosclerosis: the analogy between early in-vivo lesions and deposits which occur in extracorporal circulations.

Can. Med. Assoc. J. 87 : 259 – 274 (1962)

93. Musial, I.; Niewiarowski, S.; Edmunds, L.H.; Addonizio, V.P; Nicolaou, K.C.; Colman, R.W.:

In-vivo release and turnover of secreted platelet proteins in rhesus monkey (M. Mulatta).

Blood 56 : 596 – 603 (1980)

94. Mustard, J.F.; Packham, M.A.:

Factors influencing platelet function: adhesion, release and aggregation.

Pharmacol. Rev. 22 : 97 – 188 (1970)

95. Niewiarowski, S.:

Proteins secreted by the platelet.

Throm. Haemost. 38 : 924 – 938 (1977)

96. Niewiarowski, S.:

Platelet release reaction and secreted platelet proteins.

In: Bloom, A.C.; Thomas, D.P. (eds), Haemostasis and Thrombosis. pp. 73 – 83 (Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York, 1981)

97. Niewiarowski, S.; Lowery, C.T.; Hawiger, I.; Millman, M.; Timmons, S.:

Immunoassay of human platelet factor 4 (PF_4, antiheparin factor) by radial immunodiffusion.

J. Lab. Clin. Med. 87 : 720 – 733 (1976)

98. Niewiarowski, S.; Thomas, D.P.:

Platelet factor 4 and adenosine disphosphate release during human platelet aggregation.

Nature 222 : 1269 – 1270 (1969)

99. Niewiarowski, S.; Walz, D.A.; James, P.; Rucinski, B.; Küppers, F.:

Identification and separation of secreted platelet proteins by isoelectric focusing. Evidence that low affinity platelet factor 4 is converted to β-thromboglobulin by limited proteolysis.

Blood 55 : 453 – 456 (1980)

100. Nimmo-Smith, R.H.:

p-nitrophenyl-β-glucuronide as substrate for β-glucuronidase.

Biochim. Biophys. Acta 50 : 166 – 169 (1961)

101. O'Brien, J.R.:

The adhesiveness of native platelets and its prevention.

J. Clin. Pathol. 14 : 140 – 149 (1961)

102. O'Brien, J.R.:

Platelet aggregation. I. Some effects of the adenosine phosphates, thrombin and cocaine upon platelet adhesiveness.

J. Clin. Pathol. 15 : 446 – 452 (1962)

103. O'Brien, J.R.; Etherington, M.; Jamieson, S.; Lawford, P.:

Heparin thrombin clotting-time and platelet factor 4.

Lancet II : 656 – 657 (1974)

104. O'Brien, J.R.; Etherington, M.D.; Shuttleworth, R.D.; Calwall, W.H.:

Platelet function in acute myocardial infarction patients compared with controls.

Thromb. Haemost. 44 : 96 – 99 (1980)

105. Packham, M.A.; Mustard, J.F.:

Non-steroidal anti-inflammatory drugs, pyrimido-pyrimidine compounds and tricyclic compounds: effect on platelet function.

In: Hirsch, J.; Cade, J.F.; Gallus, A.S.; Schöbaum, E. (eds), Platelets, drugs and thrombosis. pp. 111 – 123 (Karger, London 1975)

106. Pasetto, N.:

β-glucuronidase of blood.

Inform. Med. Sez. Clin. Sci. 10 : 287 – 295 (1955)

107. Pfeiffer, J.Jr.:

Essential fatty acids, diabetes and cholesterol.

The Hormel Institute University of Minnesota, the Annal Report: 35 – 52 (1955)

108. Pick, R.; Chediak, J.; Glick, G.:

Aspirin inhibits development of coronary atherosclerosis in cynomolgus monkeys (Macacca Fascicularis) fed an atherogenic diet.

J. Clin. Invest. 63 : 158 – 162 (1979)

109. Preston, F.E.; Word, J.D.; Marcola, B.H.:

Elevated β-thromboglobulin levels and circulating platelet aggregates in diabetic microangiopathy.

Lancet I : 238 – 239 (1978)

110. Ratcliffe, H.L.; Luginbühl, H.; Pionik, L.:

Coronary, aortic and cerebral atherosclerosis in swine of three age-groups: implications.

Bull. WHO 42 : 225 – 234 (1970)

111. Roberts, J.C.Jr.:

Ditribution and severity of spontaneous atherosclerosis in the dog.

Circulation 24 : 1101 – 1115 (1961)

112. Ross, R.:

Platelets and atherosclerosis.

Drug. Res. 33 : 1399 – 1401 (1983)

113. Rowsell, H.C.; Downie, H.G.; Mustard, J.F.:

Swine atherosclerosis and its relationship to atherosclerosis in man.

In: Proceedings of the International Symposium on Comparative Medicine, New York. pp. 215 – 221 (1962)

114. Rozenberg, M.C.; Holmsen, H.:

Adenine nucleotide metabolism of blood platelets. IV. Platelet aggregation response to exogenous ATP and ADP.

Biochim. Biophys. Acta 157 : 280 – 288 (1968)

115. Rucinski, B.; Niewiarowski, S.:

Radioimmunoassay of porcine platelet factor 4.

Fed. Proc. 39 : 425 – 443 (1980)

116. Rucinski, B.; Niewiarowski, S.; James, P.; Walz, D.A.; Budzynski, A.Z.:

Antiheparin proteins secreted by human platelets. Purification, characterization and radioimmunoassay.

Blood 53 : 47 – 62 (1979)

117. Sander, H.J.; Slot, J.W.; Bouma, N.; Bolhuis, P.A.; Pepper, D.S.; Sixma, J.J.:

Immunocytochemical localization of fibrinogen, platelet factor 4 and β-thromboglobulin in thin frozen sections of human blood platelets.

J. Clin. Invest. 72 : 1277 – 1287 (1983)

118. Scharf, R.E.; Hennerici, M.; Bluschke, V.:

Cerebral ischemia in young patients: is it associated with mitral valve prolapse and abnormal platelet activity in-vivo?

Stroke 13 : 453 – 458 (1982)

119. Schmitz, H.; Schleipen, Th.; Gross, R.:

Freie Nukleotide in normalen menschlichen Blutplättchen.

Klin. Wochenschr. 40 : 13 – 15 (1962)

120. Shattil, S.J.; Anaya-Galindo, R.; Bennett, J.; Colman, R.W.; Cooper, R.A.:

Platelet hypersensitivity induced by cholesterol incorporation.

J. Clin. Invest. 55 : 636 – 643 (1975)

121. Shattil, S.J.; Bennett, J.; Colman, R.W.; Cooper, R.A.:

Abnormalities in cholesterolphospholipid composition in platelets and low density lipoproteins of human hyperbeta-lipoproteinemia.

J. Lab. Clin. Med. 89 : 341 – 353 (1977)

122. Siegel, A.; Lüscher, E.F.:

Non-identity of the alpha-granules of human blood platelets with typical lysosomes.

Nature 215 : 745 – 747 (1967)

123. Sixma, J.J.; Sakariassen, K.S.; Houdigk, W.; Aorts, P.A.M.:

Die Bedeutung der Plättchen-Gefäßwand-Reaktion in der Pathogenese der Atherosklerose.

Drug. Res. 33 : 1355 – 1357 (1983)

124. Statistisches Bundesamt Wiesbaden (ed):

Ausgewählte Zahlen für das Gesundheitswesen 1981.

pp. 12 – 14 und 32 (Fachserie 12) Reihe 1

125. Stormoken, H.:

The release reaction of secretion: a general basic phenomenon related phagocytosis/pinocytosis.

Scand. J. Haematol. 9 : suppl.: 3 – 24 (1969)

126. Summerfield, G.P.; Keenan, J.P.; Brodie, N.J.; Bellingham, A.J.:

Bioluminescent assay of adenine nucleotides: rapid analysis of ATP and ADP in red cells and platelets using the LKB luminometer.

Clin. Lab. Haematol. 3 : 257 – 271 (1981)

127. Szasz, G.:

Die Bestimmung der β-Glucuronidase-Aktivität im Serum mit p-Nitrophenyl-Glucuronid.

Clin. Chim. Acta 15 : 275 – 282 (1967)

128. Tashjian, R.J.; Das, K.M.; Palich, W.E.; Hamlin, R.L.; Yarus, D.A.:

Studies on cardiovascular disease in the cat.

Ann. NY. Acad. Sci. 127 : 581 – 605 (1965)

129. Ten Cate, J.W.; Vos, J.; Oosterhuis, H.; Prenger, D.; Jenkins, C.S.P.:

Spontaneous platelet aggregation in cerebrovascular disease.

Thromb. Haemost. 39 : 223 – 229 (1978)

130. Thomas, D.P.; Niewiarowski, S.; Ream, V.J.:

The release of adenine nucleotides and platelet factor 4 from the blood platelets of man and four other species.

J. Lab. Clin. Med. 75 : 607 – 618 (1970)

131. Tosch, U.:

Thrombozytenaggregation in vitro: vergleichende Untersuchungen an acht verschiedenen Spezies.

Diss. Techn. Univ. München (1981)

132. Tosch, U.; Benner, K.U.:

Comparative nephelometric aggregation studies with platelets from various species.

Microvasc. Res. 17 : 50 (1979)

133. Vaage, J.; Gjesdal, K.:

Lung responses and platelet release reaction following intravascular platelet aggregation in the cat.

Scand. J. Clin. Lab. Invest. 36 : 641 – 648 (1976)

134. Varma, K.G.; Niewiarowski, S.; Holt, J.C.:

Human platelet basic protein. Its relationship to low affinity platelet factor 4 and β-thromboglobulin.

Biochim. Biophys. Acta 701 : 7 – 11 (1982)

135. Verity, M.A.; Caper, R.; Brown, W.J.:

Spectrofluometric determination of β-glucuronidase activity.

Arch. Biochem. Biophys. 106 : 386 – 393 (1964)

136. Vinazzer, H.:

Photometric assay of platelet factor 4 with a chromogenic substrate.

Haemostasis 6 : 283 – 293 (1977)

137. Ward, A.S.; Porter, N.; Preston, F.E.; Morris-Jones, W.:

Platelet aggregation in patients with peripheral vascular disease.

Atherosclerosis 29 : 63 – 68 (1978)

138. Weiss, H.J.:

Platelet physiology and abnormalities of platelet function.

N. Engl. J. Med. 293 : 531 – 580 (1975)

139. Weiss, H.J.:

Platelets and ischemic heart disease.

N. Engl. J. Med. 302 : 225 – 226 (1980)

140. Weiss, H.J.; Lages, B.A.; Witte, L.D.; Kaplan, K.L.; Goodman, De W.S.; Nossel, H.L.; Baumgartner, H.R.:

Storage pool disease: evidence for clinical and biochemical heterogeneity.

Thromb. Haemost. 38 : 3 – 15 (1977)

141. Weiss, H.J.; Witte, L.D.; Kaplan, K.L.; Lages, B.A.; Chernoff, A.; Nossel, H.L.; Goodman, D.S.; Baumgartner, H.R.:

Heterogeneity in storage pool deficiency: Studies on granule-bound substances in 18 patients including varients deficient in alpha-granules, platelet factor 4, β-thromboglobulin and platelet derived growth factor.

Blood 54 : 1296 – 1319 (1979)

142. Whigham, K.A.E.; Howie, P.W.; Drummond, A.H.; Prentice, C.R.M:

Abnormal platelet function in pre eclampsia.

Br. J. Obstet. Gynaecol. 85 : 28 – 32 (1978)

143. White, J.G.:

Physiochemical dissection of platelet structural physiology.

In: Baldini, M.G.; Ebbe, S. (eds), Platelets: production, function, transfusion and storage. pp. 235 – 252 (Grune and Stratton, New York 1974)

144. White, J.G.; Clawson, C.C.; Gerrard, J.M.:

Platelet ultrastructure.

In: Bloom, A.C.; Thomas, D.P. (eds), Haemostasis and Thrombosis. pp. 22 – 49 (Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York 1981)

145. Wiley, J.S.; Chesterman, C.N.:

The effect of sulphinpyrazone on the aggregation and release reaction of human platelets.

Thromb. Res. 14 : 23 – 33 (1979)

146. Wissler, R.W.:

How does „spontaneous" atherosclerosis in animals compare to that in man?

In: Roberts, J.C.Jr.; Straus, R. (eds), Comparative Atherosclerosis. pp. 342 – 359 (Hoeber Medical Division 1965)

147. Witte, L.D.; Kaplan, K.L.; Nossel, H.L.; Lages, B.A.; Weiss, H.J.; Goodman, D.S.:

Studies of the release from human platelets of the growth factor for cultured human arterial smooth muscle cells.

Circ. Res. 42 : 402 – 409 (1978)

148. Wong, E.; Rossiter, R.J.:

Inhibitors of the β-glucuronidase of rabbit polymorphnuclear leukocytes.

Can. J. Med. Sci. 29 : 195 – 207 (1951)

149. Woollen, J.W.; Heyworth, R.; Walker, P.G.:

Studies on glucuronidase: 3. testicular N-acetyl-β-glucosaminidase and N-acetyl-β-galactosaminidase.

Biochem. J. 78 : 111 – 116 (1961)

150. Wu, V.Y.; Walz, D.A.; Mc Coy, L.E.:

Purification and characterization of human and bovine platelet factor 4.

Prep. Biochem. 7 : 479 – 493 (1977)

151. Zahavi, J.; Price, A.J.; Kakkar, V.V.:

Enhanced platelet release reaction associated with general anaesthesia.

Lancet I : 1132 – 1133 (1980)

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. K. U. Benner, der mir das Thema meiner Dissertation überließ, mich mit dem Arbeitsgebiet bekannt machte, den Arbeitsplatz zur Verfügung stellte und den Fortgang der Experimente wohlwollend förderte. Sein Rat bei der Abfassung der Niederschrift war mir eine wertvolle Hilfe.

Herzlich gedankt sei weiterhin Herrn Dr. med. vet. Schmidt (Gynäkologische Klinik der Tiermedizinischen Fakultät der LMU), Herrn Dr. med. vet. Braun (Abteilung für Andrologie der Tiermedizinischen Fakultät der LMU) und Herrn Dr. med. vet. Ruprecht (Abteilung für Strahlenbiologie der GSF) für die Hilfe bei der Blutentnahme bei den untersuchten Großtieren, sowie Herrn Prof. Dr. med. U. Klein (Leiter der Radiologischen Abteilung des Deutschen Herzzentrums) und seiner medizinisch-technischen Assistentin Frau Landeck für die Ermöglichung der radioimmunologischen Bestimmung der thrombozytenspezifischen Proteine.

Lebenslauf

05. 04. 1958	geboren in Dortmund	
	Vater: Alfred Burstedde geb.: 21. 12. 1929 gest.: 09. 07. 1983 Beruf: Kaufmann	Mutter: Irmgard Burstedde geb.: 05.01.1929 (Froese) Beruf: Hausfrau
1964 – 1967	Besuch der Comenius-Grundschule in Dortmund	
1967 – 1976	Besuch des Geschwister-Scholl-Gymnasiums in Dortmund	
02. 06. 1976	Ablegen der Reifeprüfung daselbst	
30. 08. 1976 bis 07. 07. 1977	Beschäftigung als Lehrer am Geschwister-Scholl-Gymnasium in Dortmund	
Sommer-semester 1977	Immatrikulation an der Technischen Universität München im Fach Humanmedizin	
12. 04. 1983	Bestehen der Ärztlichen Prüfung an der TU München	
21. 04. 1983	Approbation als Arzt	
Juni 1983	Assistenzarzt der Abteilung Innere Medizin des Zentralkrankenhauses Gauting	
01. 08. 1983	Antritt des Wehrdienstes als vorläufiger Stabsarzt	
29. 08. 1983 bis 30. 10. 1983	Truppenarzt in Cuxhaven	
seit 31. 10. 1983	Stabsarzt an der Sanitätsakademie in München (Ende der Wehrdienstzeit: 31. 10. 1984)	